

代谢物组学方法及其在植物学研究中的应用

董登峰

(广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘要: 代谢物是生物体受遗传控制和环境影响的最终表达产物,以全体代谢物(代谢物组)为研究对象的代谢物组学是继基因组学和蛋白质组学后必然出现的又一门“组学”技术。该文综述了代谢物组的检测、数据的处理和分析等以及这些技术在植物目标分析、基因功能、代谢途径和代谢工程、整合植物学、信号转导等研究中的应用和前景。

关键词: 代谢物组学; 方法; 植物学; 应用

中图分类号: Q945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0765-05

Metabolomics approaches and their application in Botany

DONG Deng-Feng

(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Metabolites are the end products of biological systems response to genetic control and/or environmental changes. Metabolomics, which study of total metabolites (metabolome), is an inevitable ‘omics’ following by genomics and proteomics. In this paper, metabolomics approaches including metabolites qualitative and quantitative determination, data acquisition and mining as well as their application in Botany such as target analysis, gene function determination, metabolite pathways and metabolic engineering, integrity Botany, signal transduction etc were reviewed.

Key words: metabolomics; approaches; Botany; application

遗传信息由基因经转录物向功能蛋白质传递,基因功能由其表达产物来体现。上世纪90年代以来,随着对微生物、植物、动物乃至人类基因组测序工作的完成,生命科学的研究重点开始从揭示生命的所有遗传信息转向基因组功能分析和系统工程调控,研究方法上也从研究单一的基因及产物转移到同时研究生命过程中多个相关基因及产物,形成了分子系统生物学这一新兴学科,其标志是一系列“组学”方法的先后建立和应用(Oliver等,2002)。

代谢物组(metabolome)是指生物体内所有小分子代谢物的总和,是生物体的特定部分在特定环境中,经基因组表达和新陈代谢产生的中间产物及终产物,其水平代表了基因和环境变化的最终表现。代谢物组学通过测定代谢物组的含量或变化,研究生物体的系统生化谱和功能调节(Tweendale等,1998)。

根据研究对象和目的不同,Fiehn(2002)将生物代谢分析(metabolite analysis)分为目标分析(target analysis)、代谢谱分析(metabolic profiling)、代谢物组分析(metabolomics analysis)和代谢指纹分析(metabolic fingerprinting)。目标分析是对某种特定的代谢产物(如植物激素)进行分析,其目的通常是检测某个基因受扰动后对目标代谢产物浓度所产生的效应,目标分析时样品尽量纯化以减少其它代谢物的干扰。代谢谱分析是对某一完整或交叉的代谢途径功能的描述,是对预设的一系列同类型的代谢物(如脂类、糖类、类异戊二烯等)进行定性和定量研究,样品预处理时主要考虑代谢物的化学性质和衬质效应。代谢物组分析是对某一条件下所有代谢组分的定性和定量分析,样品预处理和检测时应尽量满足高灵敏度、高选择性、高通量的要求,并

收稿日期: 2006-02-10 修回日期: 2006-08-20

基金项目: 广西教育厅基金(C160008)[Supported by the Foundation of Guangxi Education Department(C160008)]

作者简介: 董登峰(1971-),男,湖北京山人,博士,副教授,从事植物逆境分子生物学研究。

减少衬质效应。对所检测到的海量数据需要进行解析。代谢指纹分析是对代谢产物进行高通量的定性,根据起源和相关性进行快速的筛选和分类(如多个基因型间的比较和疾病诊断)。

1 代谢物组学研究方法

虽然代谢物组学是功能基因组学中最年轻的成员,但它所需要的测定技术早已存在,并相对成熟。与其它功能基因组学科一样,代谢物组学以高通量或大规模实验方法学和统计、计算分析相结合为特征。研究流程包括对生物样品中代谢物进行提取和预处理、代谢组分的定性和定量检测以及对海量数据的降维解析。

1.1 代谢物的提取和预处理

目前没有一种能够适合所有代谢产物的提取和预处理方法,实际操作中应该根据不同的化合物结合检测手段而选择不同的提取方法,并对提取条件进行优化。通常用水和渗透性强有机溶剂(如甲醇)液相提取,经过层析、萃取和亲和色谱等方法获得亲水相和亲脂相,分别进行分析(Fiehn, 2002)。对于植物激素等痕量的代谢物也有用气相和动态顶空(headspace)提取(Schmelz 等, 2004)。

1.2 代谢物组分的定性和定量检测

代谢物组成结构要比 mRNA(仅由 4 种核苷酸组成)和蛋白质(由 20 种氨基酸组成)复杂得多,元素组成、分子大小、官能团、挥发性等都可能影响代谢物的分离。目前代谢物组分析技术中最常用有核磁共振(NMR)、气相色谱和质谱联用(GC/MS)、液相色谱和质谱联用(LC/MS),毛细管电泳和质谱联用(CE/MS)等,单一的检测方法能检测的代谢物种类有限,实际操作中往往采用多种分离方法并行检测以获得尽可能多的代谢产物信息。

1.2.1 核磁共振 早在 20 世纪 60 年代,NMR 就已经应用到代谢研究中,但当时质子工作频率低,能分析的代谢物较少,随着质子工作频率和测量灵敏度的提高以及模式识别技术的发展,可检测小分子物质种类增多,近年来发展的魔角旋转技术(magic angle spinning, MAS)和二维核磁共振(2D-NMR)使分辨率大幅度提高,成为代谢物组学研究的核心技术。

基于 NMR 代谢物组研究分析方法的基本步骤:首先测定一系列 NMR 谱图,不用对谱峰指认,把它看作是一个 n 维对象,直接将谱图分解成 250~1 000

个区域进行积分,得到积分强度;然后将这些简化的数据输入程序,利用主成分分析(PCA)方法得到主成分图。处于相似生理状态的样本通常具有相似的组分,在主成分图中处于相邻的位置,通过生物信息学分析可得到不同状态下的生物标志物。

生命科学领域中常用的是氢谱($^1\text{H-NMR}$)、碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)及磷谱($^{31}\text{P-NMR}$)三种。 $^1\text{H-NMR}$ 对含氢化合物均有响应, $^1\text{H-NMR}$ 谱中包含几百个甚至上千个化合物的信息,其中的化学位移、峰面积、偶合常数、弛豫时间均是解析化合物结构的依据,利用特定的软件可以很容易地把所有可溶性样品中所存在的最大的障碍信号去除而不影响分析结果,能满足了代谢物组学中的对尽可能多的化合物进行检测的目标,此外,NMR对生物材料没有损伤,经 NMR 检测后的样品仍可以用于其它分析(王全军等, 2004),但其灵敏度比 MS 差,分辨能力有限,灵敏度不高,对于浓度相差很大的成分也无法同时分析,在复杂的系统分析中尚有难度,不适合于痕量化合物的鉴定(Sumner 等, 2003)。

1.2.2 色谱质谱联用 色谱(Chromatography)是目前代谢物组研究中最常用的分离样品的技术,根据流动相不同分为气相色谱(Gas Chromatography, GC)和液相色谱(Liquid Chromatography, LC)。样品被流动相(液相或气相)带入含有固定相的色谱柱,由于各组分物质的沸点、极性 & 吸附等性质不同,每组分都倾向在流动相和固定相之间形成分配或吸附平衡,随着流动相的带动,样品组分在运动中进行反复多次分配或吸附/解吸,结果在流动相中分配浓度大的组分先流出色谱柱,而在固定相中分配浓度大的组分后流出。质谱仪对色谱分离的每一个峰进行扫描,获得每个峰的质谱图,而每个峰所代表的化合物的分子结构通过其碎片峰的类型和质/荷比(m/z 值)结合有关质谱数据库来进行鉴定,其含量可以通过峰面积的大小来定量。

GC 所能直接分离的样品应是可挥发、且是热稳定性的,沸点一般不超过 $500\text{ }^\circ\text{C}$,目前已知的化合物中,有 20% 到 25% 可用 GC 直接分析(刘虎威, 2004)。在代谢物组研究中,经常将样品衍生化(如烷基化)以降低组分的沸点,增加 GC 可检测的组分的种类。GC 的操作参数优化相对要简单,载气的成本也较低。

HPLC 采用液态的流动相,对那些不稳定、不易衍生化、不易挥发或分子量较大的化合物有较好的

分离效果,样品也不需要衍生化,结构解析方便。但 LC 与 MS 的联用受流动相的限制(刘虎威,2004)。

对植物代谢物组这一非常复杂的混合物仅仅用一根色谱柱往往达不到完全分离的目的,多维色谱分离技术是代谢物组研究发展的方向,选择不同分离特性的多根色谱柱,将第一根色谱柱分离后的组分转移到第二根柱上进行更精细的分离,甚至还可将第二根柱上分离的组分再转移到第三或更多柱上分离。可以是 GC 与 GC, LC 与 LC 单一的多维,还可以是 LC 与 GC 杂和的多维。事实上色谱/质谱联用也可看作一种多维分离技术,即第一维是质谱的保留时间,第二维是 MS 的质荷比。

1.2.3 其它分离检测技术 毛细管电泳以电势为动力带动组分的毛细管内泳动,达到分离的效果,毛细管内还可填充特定的介质以提高分离效果,各组分通过 MS 定性和定量。CE/MS 分离样品的速度和效率要比 LC/MS 和 GC/MS 快而且好,往往在 10 min 内就能完成一个样品的分析过程,是代谢物组研究中一个非常有潜力的方法,但 CE/MS 对次生代谢物效果不如初生代谢物(Soga 等,2002)。此外薄层层析(TLC)、红外(IR)和紫外(UV)光谱法等也用于代谢物组的检测(Winson,1997; Tweeddale 等,1998)。

1.3 数据的降维解析

由于获得的数据极多,进行简单的“点对点”的分析非常困难,数据分析方法首先是数据降维,采用化学计量学的方法,通过数学算法对峰进行指认并分组,整个过程的分析是非歧视性的,可以找出导致分组差异的物质(内源性或外源性的)作为新的生物标记物。数据降维分析方法可分为有监督和无监督的模式识别方法,有监督模式识别方法是在已有先验知识和假设的条件下,建立信息组,并利用所建立的组对未知数据进行辨识、归类和预测(Raamsdonk 等,2001)。这类方法包括偏最小二乘判别法(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)、判别式功能分析(discriminant function analysis, DFA)、前馈神经网络(feedforward neural networks)、遗传编程(genetic programming)、非线性回归(nonlinear regression)等。无监督模式识别方法是用来探索完全未知的数据特征的方法,对原始数据信息依据样本特性进行归类,把具有显示特征的目标数据归在同源的类里面,并采用相应的可视化技术直观地表达出来。这类方法有主成分分析(principal component analysis,

PCA)、聚类分析(cluster analysis, CA)、非自组织图(self organizing maps, SOMs)和线性作图等(Non-linear mapping, NLM),目前应用最广的是主成分分析和聚类分析(Roessner 等,2001)。

主成分分析:主成分是由原始数据按一定的权重经线性组合而成的新变量(即主成分),这些变量具有以下性质:(1)每个主成分(PC)之间是正交的(2)第一个 PC 包含了数据集中的绝大部分方差,第二个次之,依此类推,由头几个 PC 作图就能很好地代表数据所包含的生物学变化(Summer 等,2003)。

聚类分析将对象彼此不同的属性进行辨认,找出每一类事物共同的特征,根据一定的相似程度将性质相近的归入一类,通过同一类事物中一部分较为明确的物质推断其它物质的功能。聚类分析中,常用的有分级聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)和 K-值聚类(K means clustering)。分级聚类分析(HCA)是根据数据组的相似性对它们进行分组。K-值聚类与分级聚类分析相似,它是通过组的固定数字对经主成分分析转换的数据进行分类(Taylor 等,2002)。

数据降维的一般过程是:首先对数据进行无监督的模式分析,然后选定某一类样本进行数据建模,再对变量进行加权处理,选定建模的主成分数目,最后利用有监督的统计方法判别未知样本。对于一些易受环境等因素影响结果的分析需要采用滤噪技术去除了额外的影响因素,广泛应用的滤噪技术是正交信号校正技术(orthogonal signal correction, OSC),OSC 滤掉与类别判断正交(不相关)的变量信息,只保留与类别判断有关的变量,从而使类别判别分析能集中在这些与类别的判别相关的变量上,提高了判别的准确性(Gavaghan 等,2002)。

2 代谢物组学在植物科学研究中的应用

代谢物组学这一方法自提出不到十年的时间已经在植物学、毒理学、临床诊断、药物开发、营养科学等众多研究领域都得到了广泛的应用,表现出巨大的发展潜力。植物细胞代谢研究基础使得代谢物组学较早、较多地应用于植物学研究,通过定性和定量检测不同物种或不同基因型或不同生态类型的植物,在不同生长时期或受外界环境某种刺激前后的所有代谢物组变化,进而找出其中的代谢途径的改变,仍是现代代谢物组学一个重要的应用领域。

2.1 目标代谢物分析

代谢物组学检测技术具有快速、高通量和无偏的特点,方便地用于植物在环境条件改变下或者同一植物不同部位或不同时期的大量的目标代谢物种类与含量变化。糖类、多元糖醇类、甜菜碱、脯氨酸及其类似物等物质理化性质不同,但在功能上都与植物的抗性有关,传统上根据其特异的理化性质分别取样测定,成本高,需要的样品多,取样误差大,预处理复杂,耗时长而且回收率不一致带来了分析上的困难,Naidu(1998)利用 HPLC 方法简单、快速、灵敏和低成本地同时检测花生和棉花中这些渗透调节物质的含量。Fiehn(2003)利用 GC/MS 对笋瓜的叶柄脉管抽提物和叶片抽提物进行了代谢物分析,得到了 400 多个峰,通过与质谱数据库对比,对其中 90 多种目标代谢物进行了定性,比较了叶柄与叶片间代谢物组分的差异。

2.2 基因的功能确定

mRNA 的含量与蛋白质的表达水平相关系数通常不高,蛋白质还存在翻译后的修饰现象,所以只从 mRNA 和蛋白质水平上来研究基因的功能是远远不够的。从代谢物组学分析所获得的信息与生物的表现型和生理状态最接近,能更准确揭示基因和表现型之间的关系,达到检测和推断基因功能的目的。此外,转基因植物或突变体往往并没有明显的表型变化,如拟南芥中就有 90% 的突变体是沉默型突变体,人们很难通过表现型的变化来确定有关基因的功能,然而,转基因生物和敲除(knockout)突变体中的某些代谢物的含量却常常发生变化,通过代谢产物水平变化的分析,就可以把它们与野生型区分开来。比较已知功能基因的缺失与未知基因功能缺失的相似性,也是目前可以利用的确定基因功能的一种重要手段,若敲除一个未知功能的沉默基因可以在一个代谢途径上产生与敲除一个已知功能基因的突变体相同的代谢物浓度的变化,则说明这两个基因作用于同一代谢途径(Cornish-Bowden 等, 2001)。Schnable 等(1994)比较众多影响角质层的蜡累积的单基因突变体与野生型的蜡质成分的变化来揭示突变的基因的代谢功能。Roessner 等(2001)和 Lytovchenko(2002)先后通过研究转基因马铃薯不同块茎和叶片的代谢产物水平变化确定基因的功能。

2.3 代谢途径和代谢工程

一条代谢途径典型地由一系列的代谢物组成并

由几种酶共同控制,这些酶是受多层次和连锁调控的。在复杂的代谢网络中,多条代谢途径之间相互交叉,某一代谢产物共同属于多条代谢途径,处于代谢网络的节点上,它在不同代谢途径的流量(flux)分配受遗传控制和环境扰动。研究代谢的传统方法是通过同位素示踪或局部地检测几种预定的代谢产物,再结合“关键酶”的动力学特点和亚细胞定位等来验证假想的途径,这种方法所得到的信息量少,有很强的主观倾向性,不能定量地调控代谢途径中代谢流的大小和构建新的代谢途径。运用代谢物组学技术,同时检测和分析数百种甚至上千种代谢产物来全局地认识和调控代谢成为可能(Fernie 等, 2005; Okasman 等, 2005),利用植物专一的数据库如 Ara-Cyc(Mueller 等, 2003)和代谢可视化工具如 MAPMAN(Thimm 等, 2004)使实验者容易地从头构建所需要的代谢途径,甚至可以通过检测仅仅少数相关的代谢物间动态变化来确定代谢途径和代谢网络(Camacho 等, 2005)。Edward 等(1998)利用 NMR 和 GC/MS 技术揭示了缺氧玉米诱导根系回补途径和糖酵解旁路增强, Krebs 途径较稳定,并研究了其胞内 pH 调控的机理。Rontein 等(2002)利用 NMR 综合分析番茄细胞三个不同生长阶段中心代谢和多聚物积累代谢流,揭示通过中心途径的代谢流量非常恒定,而通过多聚物合成的代谢流可变性较大。

2.4 整合植物学研究

将作为基因表达的最终产物的代谢物组信息与作为“中间产物”的转录组和蛋白质组信息结合起来可以克服各自的缺陷,相互验证、相互补充,获得对基因表达整个事件完整而清晰的认识。这在植物学研究中已取得较好的成果(Suzuki 等, 2002; Hirai 等, 2004),尤其在基因功能分析方面,如类戊二烯(Lange 等, 2001)、三萜类(Suzuki 等, 2002)和黄酮类(Tohge 等, 2005)等次成物质的生物合成基因功能的确定,已成为目前植物学研究最活跃的领域之一。目前我们正利用代谢物组学技术对拟南芥和大豆在干旱、低温和高 CO₂ 胁迫下代谢物组变化,以期与早期获得的表型、比较基因组信息整合,为抗性育种提供理论依据。

2.5 信号转导

外界环境、激素等信号通过复杂的信号网络作用调控生长、发育、繁殖以及胁迫反应。综合代谢物组学方法,定量测定大量的代谢物改变可能完全阐明复杂信号间的转导关系,解释植物代谢的基因多

效性,协同和/或阻遏激素间信号互作。Schmelz 等(2004)研究了丁香极毛杆菌侵染的拟南芥水杨酸、肉桂酸、茉莉酸、吲哚乙酸、赤霉素、不饱和脂肪酸等代谢物变化,阐明拟南芥抗丁香极毛杆菌的水杨酸介导的信号转导途径。

2.6 其它

根据植物代谢物尤其是次生代谢物的差异进行化学分类已成为经典的植物分类方法,代谢物组学高通量的检测手段和数据处理方法为分类指标的准确筛选和确定提供了依据,大大促进这一分类方法的发展,转基因植物及食品的生物安全性评估、植物间的化感作用、外来优势植物入侵等生态问题的研究也会随着代谢物组学技术的应用而发展,国外已经有一些实验室开始从事这些方面的研究。

3 问题和展望

从代谢物组学的提出至今不到 10 年的时间,代谢物组学研究取得了飞速的发展,已成为生命科学、环境和医药等学科的研究热点和前沿。国外公共和私人的研究所看到代谢物组学的潜力,将研发重点转移到代谢物组学,有的还专门为代谢物组学成立了公司(如 Metanomics 公司和 Invivo 代谢物组学公司)以争夺这一技术的制高点(Sumner 等,2003)。紧跟国际形势,国内代谢物组学的研究也已经展开并活跃起来,如军事医学科学院和中科院国家色谱研究分析中心正在致力于建立代谢物组学技术平台;2003 年 9 月中科院生命科学与生物技术局在上海召开了“植物、微生物代谢物组学研究学术研讨会”,旨在及时部署代谢物组学研究(邱德有等,2004)。

代谢物组学的产生和发展的前提和支柱是获得大量信息的分析技术和处理海量数据的计算技术,但是这两大技术目前均不够成熟和完善,因而较多的工作都集中在技术方法和理论的探索上。现在多数检测技术最多只能分离 400 多种代谢物,所以实际操作中都是选择性地提取结合各种分析技术或同时采用多种检测技术并行分析,常用不同检测技术(甚至不同仪器)所得的数据之间的转换、整合分析及误差校验等还没有准确而通用的方法,所以代谢物组学的发展要求完善和提高现有测定技术的通量、灵敏度和适用性,寻求更完美的测定技术。转换、储存和分析代谢物组海量的数据以及把它们和转录组学、蛋白质组学、表现等数据整合在一起,还

缺乏更高效的数学分析技术以及代谢物组数据库和转换模式。此外由于植物代谢物种类多(约 20 多万种)并且定位专一,代谢途径也常常涉及到多细胞器协作,代谢物组学技术应用到植物研究中还需要建立更广泛而客观的植物代谢专门数据库,以及有效的代谢模拟工具。

致谢: Illinois 大学 Hans Bohnert 教授和 Indu Rupassara 博士指导作者参与大豆代谢物组学研究。

参考文献:

- 刘虎威. 2004. 气相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 3-13
- Camacho D, de la Fuente A, Mendes P. 2005. The origin of correlations in metabolomics data[J]. *Metabolomics*, 1: 53-63
- Cornish-Bowden A, Cardenas M L. 2001. Silent genes given voice [J]. *Nature*, 409(10): 571-572
- Edwards S, Nguyen BT, Do B, et al. 1998. Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the Krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Plant Physiol*, 116: 1 073 - 1 081
- Fernie AR, Geigenberger P, Stitt M. 2005. Flux: an important, but neglected component of functional genomics [J]. *Curr Opin Plant Bio*, 8: 174-182
- Fiehn O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes[J]. *Plant Mol Bio*, 48: 155-171
- Fiehn O. 2003. Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem [J]. *Phytochem*, 62: 875-886
- Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK. 2002. Physiological variation in metabolic phenotype and functional genomic studies use of orthogonal signal correction and PLS-DA[J]. *FEBS Lett*, 530(123): 191-196
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, et al. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 101: 10 205-10 210
- Lange BM, Ketchum RE, Croteau RB. 2001. Isoprenoid biosynthesis metabolite profiling peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis[J]. *Plant Physiol*, 127(1): 305-314
- Lytovchenko A, Bieberich K, Willmitzer L, et al. 2002. Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase[J]. *Planta*, 215: 802-811
- Naidu BP. 1998. Separation of sugars, polyol, proline analogues, and betaines in stressed plant extracts by high performance liquid chromatography and quantification by ultra violet detection[J]. *Aust J Plant Physiol*, 25: 793-800
- Oksmann B, Kaldentey KM, Saito K. 2005. Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways[J]. *Curr Opin Biotech*, 16: 174-179

(下转第 691 页 Continue on page 691)

- Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 1999. Studies of morphological and allozyme variation of the endangered *Adenophora lobophylla* and its widespread congener *A. potaninii* (濒危物种裂叶沙参及其近缘广布响泡沙参的遗传多样性研究)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **26**(4):410-417
- Li JH(李建华), Xiang QP(向巧萍). 2005. Phylogeny and biogeography of *Thuja* L. (Cupressaceae), an Eastern Asian and North American disjunct genus (东亚-北美间断分布属崖柏属(柏科)的系统演化和生物地理研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **47**(6):651-659
- Song CW(宋丛文), Zhang XY(张新叶), Hu XY(胡兴宜), et al. 2004. Analysis on genetic diversity within species of *Taiwania flousiana* by RAPD (杉种内遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Hubei Fore Sci Tech* (湖北林业科技), **4**:1-4
- Su HL(苏何玲), Tang SQ(唐绍清). 2004. Genetic diversity of the endangered plant *Abies ziyuanensis* in two populations (濒危植物资源冷杉遗传多样性研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **24**(5):414-417
- Tang X(唐熙), Li ZY(李振宇), Hu YX(胡玉熹). 2005. Wood anatomy of *Thuja sutchuenensis* endemic to China (中国特有濒危植物崖柏的木材结构研究)[J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **23**(2):149-153
- Wang QY(王秋玉), Ren XQ(任旭琴), Jiang J(姜静). 2004. Genetic diversity for the provenance of *Picea koraiensis* by RAPD markers (红皮云杉地理种源遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *J Northeast Fore Univ* (东北林业大学学报), **32**(6):1-3
- Yeh F C, Young R C, Timothy B, et al. POPGENE 32. [computer program]. University of Alberta, Canada
- Zhang DY(张大勇), Jiang XH(姜新华). 1999. Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species (遗传多样性与濒危植物保护生物学研究进展)[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **7**(1):31-37
- Zhang H(张哈), Sha W(沙伟). 2003. The application of RAPD technique in studying genetic diversity (RAPD 技术在遗传多样性研究中的应用)[J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), **21**(3):81-85
- Zhang WH(张文辉), Zu YG(祖元刚), Liu GB(刘国彬). 2002. Population ecological characteristics and analysis on endangered cause of ten endangered plant species (十种濒危植物的居群生态学特征及致危因素分析)[J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **22**(9):1512-1520
- Zhao J(赵锦), Liu MJ(刘孟军), Lu ZR(吕增仁), et al. 2000. The application of RAPD technique in studying genetic diversity of plant (RAPD 技术及在植物遗传多样性研究中的应用)[J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), **23**(1):25-28

(上接第 769 页 Continue from page 769)

- Oliver DJ, Nikolau B, Wurtele ES. 2002. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses [J]. *Metabolic Engin*, **4**:98-106
- Qiu DY(邱德有), Huang LQ(黄璐琦). 2004. Metabolomics- an important part of functional genomics (代谢组学研究—功能基因组学研究的重要组成部分)[J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), **2**(2):165-177
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, et al. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations [J]. *Nat Biotech*, **19**(1):45-50
- Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR. 2001. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems: identification of phenocopies [J]. *Plant Physiol*, **127**:749-764
- Rontein D, Dieuaid-Noubhani M, Duforc EJ, et al. 2002. The metabolic architecture of plant cells-stability of central metabolism and flexibility of metabolic pathways during the growth cycle of tomato cells [J]. *J Bio Chem*, **277**:43948-43960
- Schmelz EA, Engelberth J, Tumlinson JH, et al. 2004. The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites [J]. *Plant J*, **39**:790-808
- Schnable PS, Stinard PS, Wen TJ, et al. 1994. The genetics of cuticular wax biosynthesis [J]. *Maydic*, **39**:279-287
- Soga T, Ueno Y, Naraoka H, et al. 2002. Simultaneous determination of anionic intermediate for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electro-spray ionization mass spectrometry [J]. *Analy Chem*, **744**:2233-2239
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in functional genomics era [J]. *Phytochem*, **62**:817-836
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, et al. 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, **32**:1033-1048
- Taylor J, King RD, Altmann T, et al. 2002. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. *Bioinform*, **18**:241-248
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, et al. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants overexpressing a MYB transcription factor [J]. *Plant J*, **42**:218-235
- Tweendale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. 1998. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("Metabolome") analysis [J]. *J Bacteriol*, **180**(19):5109-5116
- Wang QJ(王全军), Wu CQ(吴纯启), Liao MY(廖明阳). 2004. Progress in research of metabolomics (代谢物组学的研究进展) [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), **13**:776-780
- Winson MK. 1997. Diffuse reflectance absorbance spectroscopy taking in chemometrics (DRASTIC). A hyperspectral FT-IR based approach to rapid screening for metabolite overproduction [J]. *Anal Chim Acta*, **348**(1-3):273-282