

基于代谢组和转录组的酸枣仁活性成分生物合成关键基因的初步筛选研究

陈继聪¹, 孙航¹, 练从龙¹, 马蕊¹, 赵乐¹, 陈随清¹, 刘秀玉^{1,2*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700

摘要: 目的 旨在深度挖掘参与斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 生物合成的关键基因。方法 选取青果期和成熟期的酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* 作为供试材料, 进行转录组和代谢组学分析, 通过功能注释和差异表达基因分析, 系统解析与斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 生物合成途径相关的关键候选基因。结果 通过代谢组学分析共检测到 1 646 种代谢物; 转录组测序及功能注释鉴定出 7 316 个差异表达基因。研究发现, 斯皮诺素在酸枣仁青果期相对富集, 酸枣仁皂苷 A 在成熟期显著富集。结合系统发育和热图分析, 筛选出 50 个关键候选基因, 包括 33 个 *UGTs*、12 个 *OMTs*、2 个 *OSCs* 和 3 个 *CYP450s* 基因, 推测其可能参与斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的下游生物合成途径。结论 系统解析并推测了斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的生物合成途径, 为后续功能元件鉴定奠定基础, 拓展了酸枣仁活性成分的分子生物学研究, 为中药资源开发利用提供了新思路。

关键词: 酸枣仁; 代谢组学; 转录组学; 斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3121-21

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.024

Preliminary screening of key genes for biosynthesis of active components of *Ziziphi Spinosae Semen* based on metabolome and transcriptome

CHEN Jicong¹, SUN Hang¹, LIAN Conglong¹, MA Rui¹, ZHAO Le¹, CHEN Suiqing¹, LIU Xiuyu¹

1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. National Key Laboratory of Quality Assurance and Sustainable Utilization of Authentic Medicinal Materials, Beijing 100700, China

Abstract: Objective This study aimed to comprehensively identify the key genes involved in the biosynthesis of spinosin and jujuboside A. **Methods** *Ziziphi Spinosae Semen* samples at green fruit and mature stages were selected as experimental materials to construct transcriptomic and metabolomic datasets. Key candidate genes associated with the spinosin and jujuboside A biosynthesis pathways were systematically analyzed through functional annotation and differential expression gene analysis. **Results** Metabolomic profiling detected 1 646 metabolites, while transcriptomic sequencing and functional annotation identified 7 316 differentially expressed genes. Results revealed that spinosin was relatively enriched during the green fruit stage of *Ziziphi Spinosae Semen*, whereas jujuboside A accumulated predominantly at the mature stage. Through phylogenetic and heatmap analyses, 50 key candidate genes were screened, including 33 *UGTs*, 12 *OMTs*, two *OSCs*, and three *CYP450s*, which are hypothesized to participate in the downstream biosynthesis of spinosin and jujuboside A. **Conclusion** This work systematically deciphers and proposes biosynthetic pathways for these components, laying a foundation for subsequent functional gene validation. It advances molecular biology research on *Ziziphi Spinosae Semen* bioactive compounds and provides novel insights for the development and utilization of traditional Chinese medicine resources.

Key words: *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosus* (Bunge) Hu ex H. F. Chou; metabolomics; transcriptomics; spinosin; jujuboside A

收稿日期: 2025-12-02

基金项目: 河南中医药大学博士科研启动基金项目 (00104311-2024); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2021GGJS086); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

作者简介: 陈继聪, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分合成途径解析及其异源生产研究。

Tel: 19840988037 E-mail: chenjicong3210@163.com

*通信作者: 刘秀玉, 博士, 硕士生导师, 从事中药活性成分合成途径解析及其异源生产研究。

Tel: 18239983903 E-mail: liuxiuyuzy@163.com

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子^[1], 又名枣仁、酸枣核^[2]。其味甘、酸, 性平, 归肝、胆、心经, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗生津功效^[3]。酸枣仁最早记载于《神农本草经》, 主要分布于河北、陕西、河南、辽宁等地^[4-6]。现代药理学研究表明, 酸枣仁具有广泛的药理作用, 包括镇静催眠^[7]、抗抑郁^[8-9]、增强免疫功能^[10]以及抗心律失常^[11]和抗心肌缺血^[12]等。随着酸枣仁药用价值的不断挖掘, 其市场需求逐年递增, 价格也随之攀升。目前, 酸枣仁原料主要依赖野生资源的采集, 然而在市场驱动下, 诸如“抢青”“盗采”“砍树”等破坏性采收行为屡见不鲜, 不仅导致野生酸枣树资源锐减, 也使得药材品质大打折扣。野生资源的不可持续性和次生代谢产物批次稳定性不足的问题, 已成为制约酸枣仁产业可持续发展的关键瓶颈^[13]。

酸枣仁中含有结构多样的化学成分, 包括黄酮类、萜类、多糖和生物碱等^[14-16], 其中斯皮诺素 (spinosin) 和酸枣仁皂苷 A (jujuboside A) 是酸枣仁发挥镇静、催眠作用的主要成分, 且在治疗失眠、抑郁等疾病方面已取得显著疗效^[17]。斯皮诺素具有镇静催眠、抗焦虑、抗炎等作用^[18-20], 已被用于开发新型的药食同源天然镇静催眠药物制剂。此外, 斯皮诺素还可通过调控纤溶酶活性, 改善阿尔茨海默症相关突触功能障碍^[21]。酸枣仁皂苷 A 则具有镇静安神、抗氧化、抗肿瘤等功效^[22-24], 还可以通过激活特定通路改善阿尔茨海默症小鼠模型的认知缺陷^[25]。作为酸枣仁的主要药效成分, 斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的活性直接反应了酸枣仁的传统功效, 其含量高低对酸枣仁药材的品质具有重要影响。

斯皮诺素作为黄酮类化合物, 其生物合成遵循典型的苯丙烷类代谢途径^[26]。在苯丙烷代谢的初始阶段, 由苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 催化苯丙氨酸 (phenylalanine) 脱氨生成肉桂酸, 随后经肉桂酸-4-羟化酶 (*trans*-cinnamate-4-monooxygenase, C4H) 羟基化形成对香豆酸, 再经 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-CoA ligase, 4CL) 催化生成关键中间体对香豆酰辅酶 A (ρ -coumaroyl-CoA)。在黄酮骨架形成阶段, 查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 催化对香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 的缩合反应生成柚皮素查耳酮, 经查耳酮异构酶 (chalcone isomerase,

CHI) 异构化形成柚皮素。黄酮合酶 (flavone synthase, FNS) 通过氧化脱氢反应催化柚皮素转化为芹菜素, 该化合物是黄酮 C-糖苷类化合物斯皮诺素形成的关键前体^[27]。下游反应推测涉及 UDP-糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGTs) 催化的糖基化过程: 首先, 在芹菜素 C-6 位发生糖基化反应生成异牡荆素 (isovitexin); 随后催化 2'-O- β 位的糖基化反应生成异牡荆素 2'-O- β -D-葡萄糖苷, 最后经 O-甲基转移酶 (O-methyltransferases, O-MTs) 催化 7-OH 位甲基化反应, 生成斯皮诺素。

酸枣仁皂苷 A 属于达玛烷型四环三萜化合物, 具有萜类共同的生源途径: 乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 通过甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 生成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP), 丙酮酸 (pyruvate) 和 D-甘油醛-3-磷酸 (D-glyceraldehyde 3-phosphate) 经 2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓糖醇途径 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP) 生成二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP)^[17], 其中 MVA 途径在三萜皂苷的生物合成中起到主导作用^[28]。IPP 和 DMAPP 在牻牛儿基焦磷酸合酶 (geranyl diphosphate synthase, GPPS) 催化下缩合生成香叶基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP)^[29]。GPP 在法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPPS) 的催化下依次添加 2 分子 IPP, 形成法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP), FPP 在鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS) 催化下缩合生成角鲨烯 (squalene), 随后在角鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SE) 的作用下环氧化生成 2,3-氧化鲨烯 (2,3-epoxysqualene)^[30]。推测 2,3-氧化鲨烯经氧化鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclases, OSCs) 催化合成达玛烯二醇 (dammarene diol II), 之后经细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450s, CYP450s) 等氧化酶催化形成四环三萜中间体。该中间体最终由 UGTs 催化糖基化, 生成酸枣仁皂苷 A。

目前, 针对酸枣仁资源调查、药理作用等方面的研究成果较多, 但对其主要活性成分代谢途径的研究相对不足。在中药领域, 随着化学成分及其药理作用的不断发现, 利用生物合成技术生产中药有效成分已成为研究热点。尤其是转录组和代谢组技术, 为揭示中药有效成分的生物合成途径提供了关键技术支持。用现代分子技术解析酸枣仁活性成分斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的生物合成途径, 是科学

阐释酸枣仁品质形成机制的重要内容,也是保障中药资源可持续利用的基础生物学问题。通过这些技术,关键基因的分析 and 发现已成为深入探究中药药用成分生物合成的重要手段^[31]。本研究选取不同发育时期的酸枣仁样本进行代谢组分析,并基于第二代测序技术对其进行转录组测序。通过功能注释和差异表达基因分析,推测斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 生物合成途径,并筛选出参与其生物合成的候选基因,将为酸枣仁活性成分的合成途径解析及功能基因鉴定奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

酸枣样品分别于 2024 年 7 月 3 日(青果期:此时酸枣果实表面全部呈绿色,且果实较小)和 2024 年 9 月 9 日(果实成熟期:此时酸枣果实表面全红,色泽加深,果肉开始变软并发生糖化)在河南省平顶山市宝丰县(113°25.20"E, 33°54'28.80"N)同一株酸枣树上采摘。采摘后破壳取仁,样品分别标记为 QZJ(青果期)和 ZJ(成熟期),每个时期均进行 3 次重复(QZJ-1、QZJ-2、QZJ-3、ZJ-1、ZJ-2、ZJ-3)。经液氮处理后,样品被保存于-80 °C 冰箱中。酸枣仁样品经河南中医药大学练从龙副教授鉴定,确认为鼠李科枣属植物酸枣 *Z. jujuba* var. *spinosa* 的种子。

1.2 仪器与试剂

Vanquis 分析纯化液相色谱系统(赛默飞世尔科技公司),Orbitrap Exploris™ 120 高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司),Fresco™ 17 微量离心机(赛默飞世尔科技公司),PS-60AL 超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司),全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司),真空冷冻干燥机(四环福瑞科仪科技发展有限公司)。对照品斯皮诺素(批号 MUST-24112303)、酸枣仁皂苷 A(批号 MUST-24031604)购于成都曼思特生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。质谱级甲醇、乙腈、异丙醇购于河北四友卓越科技有限公司。超纯水购于长江和记有限公司。

2 方法

2.1 非靶标代谢组学检测

2.1.1 代谢物提取 对不同发育时期的酸枣仁样本分别设置 3 个生物学重复,共 6 个样本进行代谢组学分析。将样本冷冻干燥后,于低温条件下精确称取固体样本(25±1) mg 于 EP 管中,加入匀浆珠,并添加 1 000 μL 提取液(提取液由甲醇、乙腈

和水按体积比 2:2:1 配制而成,且含有同位素标记内标)。使用涡旋振荡器混匀 30 s 后,将 EP 管放入匀浆仪中,以 35 Hz 的频率匀浆 4 min。之后,将样本转移到冰水浴中超声 5 min,重复此步骤 3 次。接着,在-40 °C 条件下静置样本 1 h。随后,将样本在 4 °C、12 000 r/min(离心力 13 800×g,转子半径 8.6 cm)的条件下离心 15 min,取上清液。再次将上清液在相同温度和转速下离心 15 min 后,将最终的上清液转移至进样瓶中,供仪器检测使用。

2.1.2 上机检测和数据处理 对酸枣仁中的非极性代谢物进行分析,使用 Vanquish(Thermo Fisher Scientific)超高效液相色谱仪,并使用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 2.6 μm)对目标化合物进行色谱分离。液相色谱的 A 相为含 0.01% 乙酸的水溶液, B 相为体积比 1:1 的异丙醇和乙腈混合溶液。样品盘的温度维持在 4 °C,进样体积为 2 μL。

质谱分析则使用 Orbitrap Exploris 120 质谱仪,在 Xcalibur 控制软件(版本 4.4, Thermo 公司)的控制下,采集一级和二级质谱数据。最后,利用 ProteoWizard 软件将原始数据转换为 mzXML 格式,并通过 BiotreeDB 数据库(V3.0)对代谢物进行鉴定,随后开展可视化分析。

2.2 RNA 提取与测序

采用擎科生物 Trelief® Hi-Pure Plant RNA Plus Kit 总 RNA 提取试剂盒,分别从不同生长发育时期酸枣仁中提取总 RNA。随后应用琼脂糖凝胶电泳、超微量分光光度计 Nano Drop One 等对提取的 RNA 进行浓度、纯度、完整性和 RNA 值等检测,选取 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.8~2.1、电泳条带清晰且无拖尾的 RNA 样品进行后续分析^[32]。

利用诺唯赞 VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina 转录组文库构建专用试剂盒 NR605 从总 RNA 中分离出酸枣仁的 mRNA,通过磁珠将 mRNA 随机断裂成约 300 bp 的小片段,以 mRNA 为模板反转录合成一条 cDNA 链,随后将进行双链 cDNA 合成,形成稳定的双链结构^[17]。再进行接头连接,配制相应体系在 PCR 仪中进行连接反应,经纯化后置于 PCR 仪中进行文库扩增反应,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对构建的文库进行质量评估。本研究中的 RNA 提取和测序工作委托武汉贝纳科技有限公司完成。

2.3 测序质量控制及参考基因组比对

将测序后的 Raw Reads 进行过滤, 去除接头、重复低质量的序列, 获得 Clean Reads, 使用 fastqc (版本: 0.11.9) 对过滤后的数据进行质量控制, 确保数据的准确性和可靠性。随后, 运用 StringTie 组装软件 (版本: 2.1.4) 对 Clean Reads 进行拼接, 得到 Contigs, 并进一步对其进行组装得到 Transcripts。使用 Star (版本: 2.7.9a) 软件将 clean reads 与酸枣仁参考基因组 (PRJNA974227) 进行比对, 并对结果进行详细统计。

2.4 转录本功能注释、分类和代谢途径分析

采用 Diamond blastp 程序 (版本: 2.0.6.144, 参数: 1×10^{-5}) 将新组装的转录本所编码的蛋白序列与 uniprot、Nr 等蛋白质数据库比对, 以获取序列的功能信息及蛋白参与的代谢通路信息。通过 Uniprot 数据库记录的蛋白质家族与基因本体 (gene ontology, GO) 功能节点的对应关系, 预测转录本编码蛋白的生物学功能。借助数据库间的关联性, 获得并统计 KOG/COG 注释结果, 同时进行分类统计与绘图。

运用 hmmscan 软件 (版本: 3.3.2), 基于 KOfam 和 Pfam 数据库开展结构域预测, 以明确蛋白质的保守序列、motif 和结构域。利用 topGO 软件对 GO 功能分类统计, 再通过 clusterProfiler 软件 (版本: 3.14.3) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库比对, 确定差异表达基因参与的生物合成途径, 并对相关途径进行分析整理。

2.5 差异表达基因筛选及分析

运用定量表达转录本在各样品中的 reads count 数据, 基于基因表达水平的 reads count 数值, 通过 DESeq2 软件分析样本间基因与转录本的差异表达情况。运用 FDR 值筛选显著差异表达的基因, 设定筛选标准为 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{foldchange}| > 1.0$, 统计基因显著性差异表达情况。深入分析显著性差异表达基因在不同样品中的表达水平、功能注释及功能富集等特征^[17]。

2.6 转录组与代谢组联合分析

筛选差异表达基因与差异代谢物共同富集的 KEGG 通路, 找到通路内核心对象, 用 R 中的 cor 函数计算 Pearson 相关性系数 ($|r| > 0.8$ 、 $P < 0.05$), 再用 Cytoscape 构建基因-代谢物相关性网络图。

2.7 斯皮诺素及皂苷 A 生物合成相关基因筛选

根据转录组注释和差异基因分析结果, 结合生

物合成途径中关键基因的筛选, 利用 Tertools 软件对不同发育时期的酸枣仁样本进行活性成分表达量的热图分析。同时, 采用 MEGA 软件构建系统发育树, 将候选基因与已鉴定的功能基因进行比对, 以评估基因间的序列同源性。进一步依据不同发育阶段代谢物的积累情况对候选基因进行精细化筛选。

2.8 实时定量实时 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 验证

随机选择转录组数据中筛选出的关键候选基因, 使用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性引物 (表 1)。使用 QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument 系统, 搭配 SYBR Green Qpcr MasterMix 预混液进行 RT-PCR。PCR 反应体系包括 55 ng cDNA、10 μL 预混液、0.8 μL 引物 (正向引物 0.4 μL , 反向引物 0.4 μL), 加无菌水至体积 20 μL 。

扩增程序设置为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环。每个样品 3 次生物学重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算其相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物信息

Table 1 RT-PCR primer information

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')
CYP450-1	CYP-1-F	cccagttcagttgggtccg
	CYP-1-R	tccccatacattgtctcg
CYP450-2	CYP-2-F	tgaggtttactcgtgcggtt
	CYP-1-R	tccaatctctgtccagcca
OSC-1	OSC-1-F	catggtttgccgtagagggt
	OSC-1-R	ggatctatgtcagcctgcc
OMT-1	OMT-1-F	tggttactctctctcgcca
	OMT-1-R	caatcttggggcaacaccg
OMT-2	OMT-2-F	accgtgtgggatcattggtg
	OMT-2-R	cgcatcagcactaggagacg
UGT-1	UGT-1-F	cctccccacatctcatgc
	UGT-1-R	tggttccccattgtaagaa
UGT-2	UGT-2-F	gaccgtgttcgtcgtttg
	UGT-2-R	cctcgatctctacccttctg
UGT-3	UGT-3-F	atcccaccacagatgacct
	UGT-3-R	aagcgttggaggtaagcca

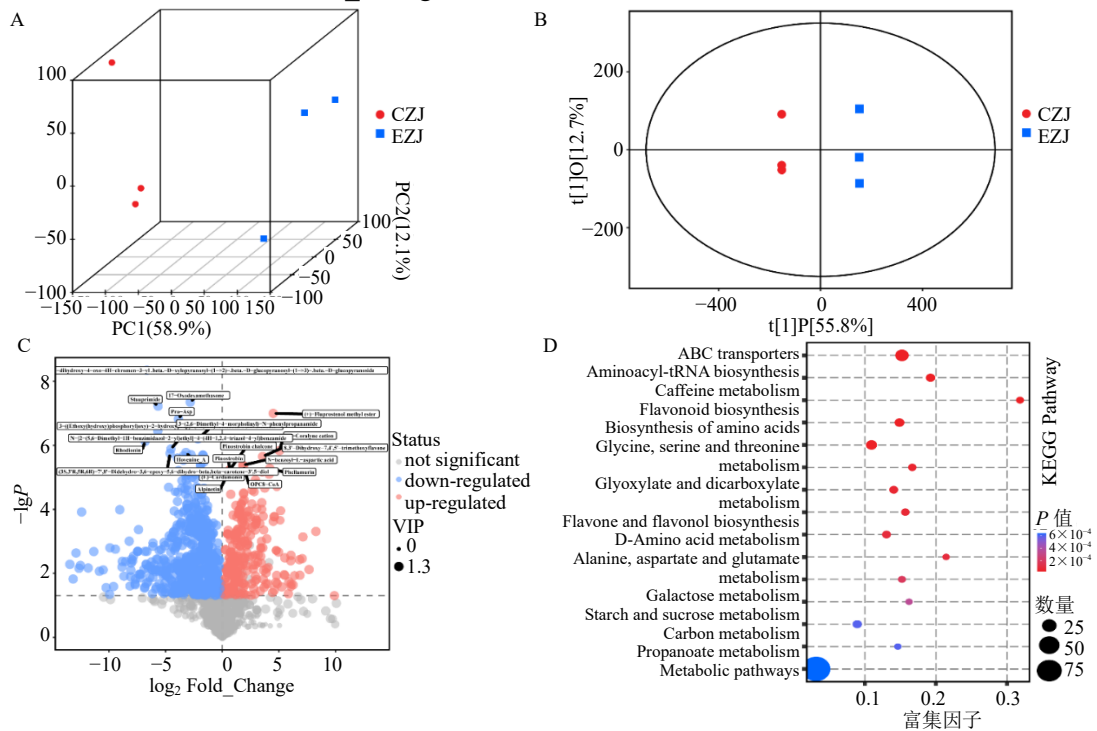
3 结果与分析

3.1 不同时期酸枣仁的代谢物差异积累分析

为系统解析酸枣仁活性成分的种类与不同发育阶段的积累特征, 本研究采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术, 在正负离子检测模式下对青果期、成熟期酸枣仁的代谢物进行非靶向检测, 每个发育时期设置 3 个生物学重复, 共计 6 个样本, 以确保代谢组学数据的可靠性与统计学意义。结合自建数据库及二级谱信息对代谢物进行表征, 共鉴定出 1 646 种代谢物。根据代谢物二级分

类标准, 将这些代谢物分为 13 组, 包括脂质和类脂分子 (484, 29.4%)、苯丙素类和聚酮类 (221, 13.43%)、有机杂环化合物 (212, 12.88%)、有机酸及其衍生物 (179, 10.87%)、苯环类化合物 (151, 9.17%)、有机含氧化合物 (122, 7.41%)、有机含氮化合物 (35, 2.13%)、生物碱及其衍生物 (23, 1.4%)、木脂素、新木脂素及相关化合物 (17, 1.03%)、核苷、核苷酸和类似物 (10, 0.61%)、有机卤素化合物 (2, 0.12%)、有机硫化物 (2, 0.12%) 和其他代谢物 (188, 11.42%)。为明确不同发育阶段酸枣仁代谢物的整体差异, 对样本进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) (图 1-A、B) [33], 结果显示青果期与成熟期样本组间分离趋势显著, 聚类特征清晰, 进一步表明青果期和成熟期的代谢物积累模式存在差异。以青果期的代谢物为对照组 (CZJ), 成熟期的代谢物为实验组 (EZJ), 将 CZJ 组对 EZJ 组进行分析比较, 采用 $Fold_Change < 0.5$

或 > 2 且 $P\text{-value} < 0.05$ 的筛选标准 (图 1-C), 共鉴定出 845 种显著差异代谢物, 其中 263 种在成熟期相对青果期上调, 582 种呈下调趋势。在上述显著差异代谢物中, 黄酮类化合物共 92 种, 包括 25 种上调, 67 种下调, 表明黄酮类化合物在青果期更易富集。同时, 萜类化合物共鉴定出 57 种显著差异组分, 其中 18 种上调, 39 种下调, 进一步表明萜类化合物具有在青果期积累的倾向 (图 1-D)。针对酸枣仁主要活性成分, 重点分析了斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 的含量差异 (图 2-A、E)。结果发现斯皮诺素在青果期相对积累量较高, 与酸枣仁发育过程中黄酮类成分的总体富集趋势相符。而酸枣仁皂苷 A 在成熟期的相对积累量较高, 这一结果与 Zhao 等 [34] 关于三萜皂苷生物合成关键时期的判定结论相符。此外, 其他代表性黄酮类化合物如柚皮素 (图 2-B)、没食子儿茶素 (图 2-C)、柚皮素查耳酮 (图 2-D) 以及萜类化合物如 *dideroside* (图 2-F)、美洲茶酸 (图 2-G)、交让木苷 (图 2-H) 等代谢物的积累特征与斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的含量差异规律一致。

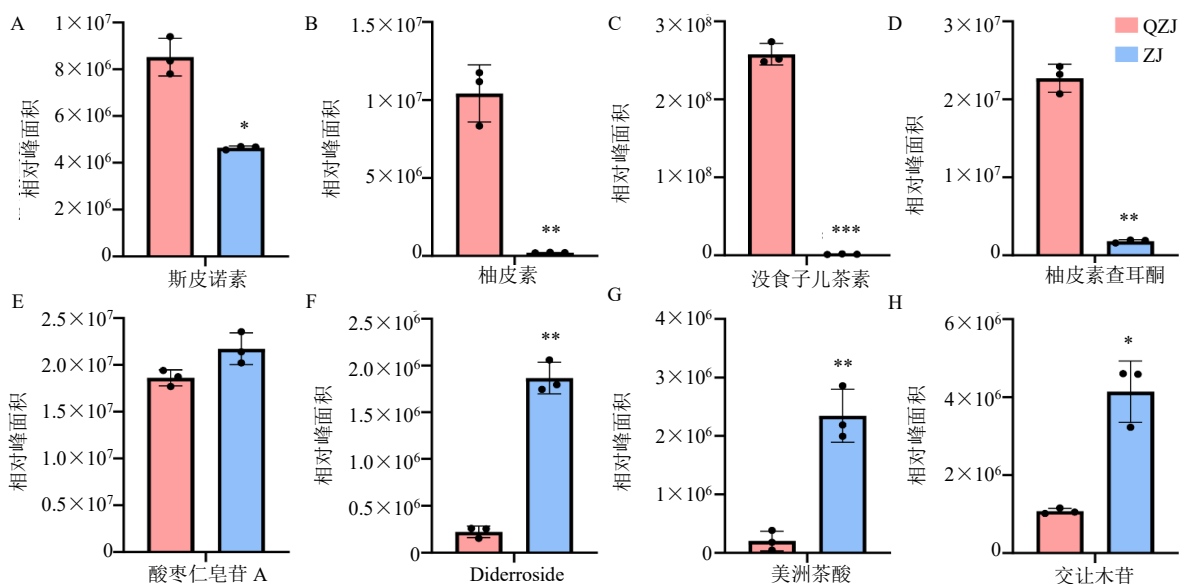


A-CZJ 组 vs EZJ 组的 PCA 模型三维得分散点图; B-CZJ 组 vs EZJ 组的 OPLS-DA 模型得分散点图; C-CZJ 组 vs EZJ 组的差异代谢物筛选火山图; D-CZJ 组 vs EZJ 组的差异代谢物 KEGG 分类图。

A-3D score scatter plot of PCA model for CZJ group vs EZJ group; B-score scatter plot of OPLS-DA model for CZJ group vs EZJ group; C-volcano plot for screening differential metabolites between CZJ group and EZJ group; D-KEGG classification plot of differential metabolites between CZJ group and EZJ group.

图 1 PCA、OPLS-DA 模型得分情况及差异代谢物的火山图和 KEGG 富集结果

Fig. 1 Score plot of PCA and OPLS-DA models, as well as volcano plot of differential metabolites and KEGG enrichment results



QZJ 为青果期, ZJ 为成熟期, 黑点为不同时期设置的 3 个重复样本, 与 QZJ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
QZJ represents the green fruit stage, and ZJ represents the mature stage, black dots indicate three biological replicates at different stages. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs QZJ.

图 2 酸枣仁中不同时期黄酮类和萜类代谢物的代谢检测结果

Fig. 2 Metabolic detection results of flavonoids and terpene metabolites in *Ziziphi Spinosae Semen* at different stages

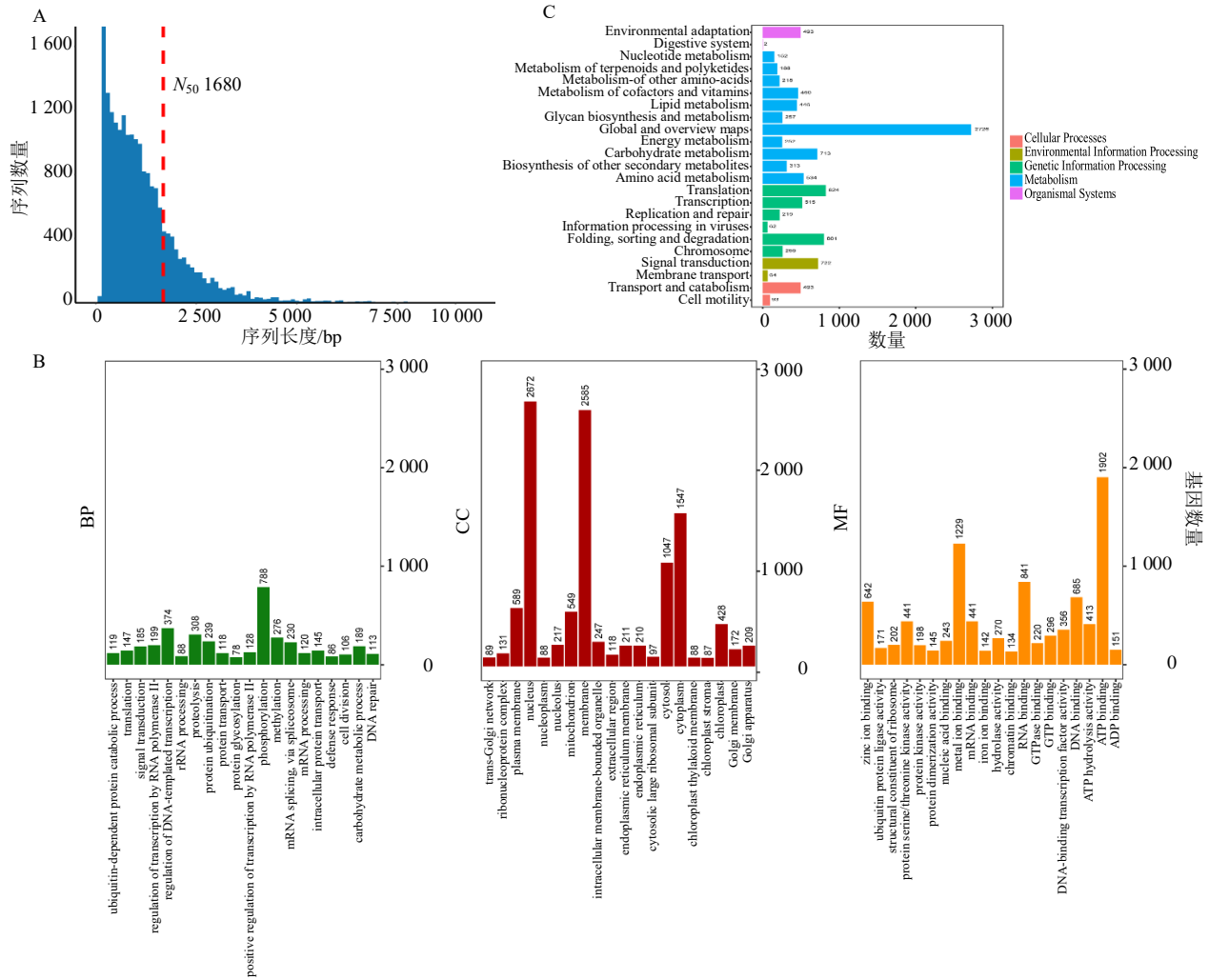
上述不同发育阶段酸枣仁的代谢物积累差异, 为后续差异表达基因分析及斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 生物合成关键酶基因的筛选提供了参考。

3.2 不同时期酸枣仁转录组测序及分析

为研究酸枣仁活性成分生物合成途径中的关键酶基因, 选择青果期和成熟期的酸枣仁共 6 个样本进行转录组测序。利用 BGI 高通量测序平台 DNBSEQ-T7 对样本进行测序。原始测序数据经过过滤后共得到 240 197 432 条 clean reads, Q_{20} 值和 Q_{30} 值的平均值分别在 $(97.87 \pm 0.15)\%$ 和 $(94.50 \pm 0.38)\%$, GC 含量平均值为 $(46.00 \pm 1.54)\%$, 显示测序质量良好。结合 Li 等^[35]解析的酸枣 *T2T* 基因组注释信息, 将过滤后的转录组序列与参考基因组比对, 共获得 240 197 356 条 clean reads, 其中比对上参考基因组的 reads 共计 227 997 088 条, 占总数的 94.92%。使用 StringTie 软件进行转录本组装, 结合 TransDecoder 预测转录本编码区, 共发现 47 619 条转录本 ($N_{50} = 2\ 379$ bp), 29 089 条 genes, 其中新转录本 20 961 条 ($N_{50} = 1\ 680$ bp), 新 gene 2 431 条 (图 3-B)。为了尽可能多地从酸枣仁转录组中挖掘出具有独特功能的基因, 使用多种数据库 [基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes,

KEGG)、KOG、NR、NT、Pfam、Uniprot、TF]对基因进行注释, 共有 28 378 条 genes 被注释, 其中在 NR 数据库和 Uniprot 数据库中有超过 90% 的基因被注释, 有超过 60% 的基因被注释到 KEGG、GO、Pfam 数据库中。

基于酸枣仁转录组数据库共鉴定到 20 961 条新转录本, 共有 18 682 条新转录本得到注释, 其中 15 584 条 (74.3%) 通过 GO 功能注释解析其在生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 及细胞组分 (cellular component, CC) 3 个方面的功能特征^[32] (图 3-C)。生物学过程分析显示, 参与蛋白质磷酸化修饰相关转录本最为丰富 (788, 5.1%), 其次为 DNA 依赖的转录调控 (374, 2.4%) 和蛋白水解作用 (308, 2.0%)。分子功能层面, ATP 结合相关基因显著富集 (1 902, 12.2%), 表明能量代谢相关蛋白的广泛参与, 金属离子结合 (1 229, 7.9%) 及 RNA 结合 (841, 5.4%) 功能次之。细胞组分分析表明, 细胞核定位转录本占据主导 (2 672, 17.1%), 与表观遗传调控功能相呼应, 其次为膜系统组分 (2 585, 16.6%) 和细胞质基质 (1 547, 9.9%)。KEGG 代谢通路注释获得 14 027 条有效注释 (占注释总量的 66.92%)。



A-经质控后的新转录本的长度分布；B-新转录本的 GO 注释，包括 BP、MF 和 CC；C-新转录本的 KEGG 代谢通路注释。
A-Length distribution of novel transcripts after quality control; B-GO annotation of novel transcripts, including BP, MF and CC; C-KEGG metabolic pathway annotation of novel transcripts.

图 3 酸枣仁中新转录本的转录组组装和功能注释

Fig. 3 Transcriptome assembly and functional annotation of new transcripts in *Ziziphi Spinosae Semen*

其中，遗传信息处理相关通路占比最高（2 680，19.1%），主要包括 RNA 转运和核糖体生物合成等通路。次生代谢通路注释到 415 条次生代谢产物合成相关基因，其中参与黄酮类代谢和萜类骨架合成的分别有 255 条和 160 条基因，这些发现为挖掘酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素的生物合成途径提供了潜在的候选基因。

3.3 差异表达基因分析及功能注释

为解析酸枣仁不同发育阶段的基因表达差异，采用 Fragments Per Kilobase Million (FPKM) 评估不同时期的基因表达水平^[36]。箱线图显示各样本基因表达分布离散程度以及整体水平差异(图 4-A)。采用 DESeq 2 分析，以 FDR<0.05 且|log₂

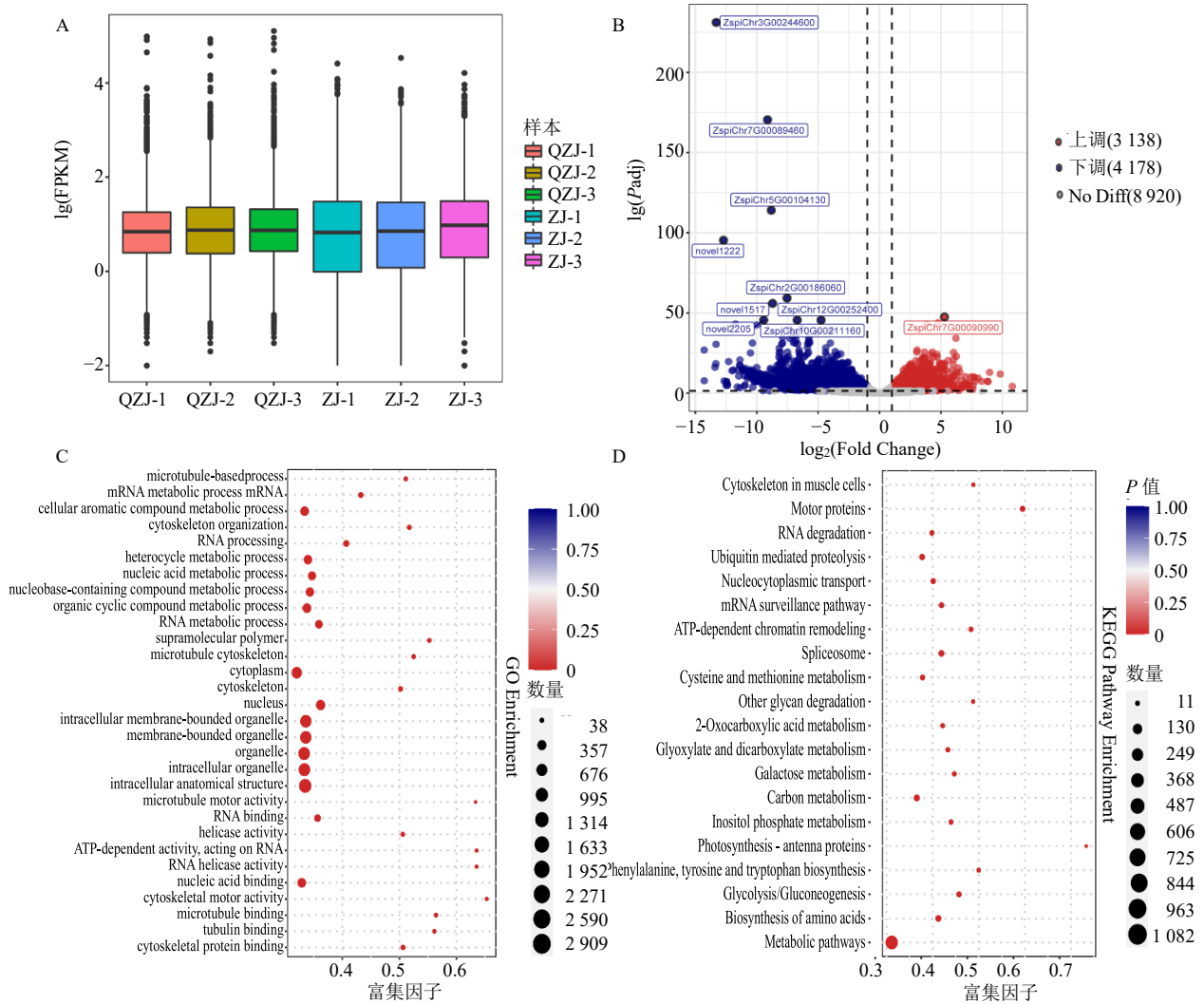
foldchange>1.0 为筛选阈值，青果期的酸枣仁为对照组，成熟期酸枣仁为实验组，共筛选获得 7 316 个差异表达基因 (differentially expression genes, DEGs)，其中上调基因 3 138 个，下调基因 4 178 个 (图 4-B)。

为进一步研究差异表达基因的生物功能，通过 GO 富集以及 KEGG 通路分析对其进行功能注释。GO 富集分析显示，差异表达基因主要富集在生物学过程、分子功能及细胞组分 3 大类别^[37] (图 4-C)。在生物学过程分类中，DEGs 显著富集于有机环状化合物代谢过程 (1 138 个)、细胞芳香族化合物代谢过程 (1 090 个) 以及杂环代谢过程 (1 054 个)，这些过程可能参与调控酸枣仁种子发育过程

中萜类、黄酮等次生代谢产物的合成与积累^[38]。分子功能分析表明，核酸结合功能（1 112 个）占主导地位，其中 DNA 结合（563 个）和 RNA 结合（487 个）相关基因可能通过调控转录与翻译过程影响次生代谢通路关键酶的表达。细胞组分分类显示 DEGs 主要定位在细胞内解剖结构（3 183 个）、细胞器（2 654 个）及其相关组分，表明代谢活动主要发生在细胞内膜系统及特定细胞器中。

在进行 KEGG Pathway 分析时，共有 2 783 条差异表达基因被注释（图 4-D），其中参与代谢途径的显著差异基因最多，有 1 183 条，占全部差异基因的 42.51%。重点关注了参与次级代谢产

物生物合成的差异基因（696，25.01%），尤其是参与黄酮和黄酮醇（flavone and flavonol）生物合成（15，0.54%）、异黄酮（isoflavonoid）生物合成（15，0.54%）、类黄酮（flavonoid）生物合成（39，1.40%）的基因，其中绝大多数差异表达基因在青果期有较高的表达。转录组和代谢组联合分析表明，上述基因在青果期呈现显著高表达模式，与代谢组检测中斯皮诺素在青果期的特异性积累趋势一致，推测在青果期表达量较高的基因可能参与酸枣仁中斯皮诺素的生物合成。此外，重点关注了参与萜类骨架（terpenoid backbone）生物合成（11，0.39%）、单萜（monoterpenoid）



A-箱线图显示 6 个样本中基因表达水平的分散程度；B-火山图显示差异基因的分布情况；C-不同时期的差异表达基因的 GO 富集分析结果；D-不同时期的差异表达基因 KEGG Pathway 富集分析结果。

A-Boxplot showing the dispersion of gene expression levels in six samples; B-volcano plot showing the distribution of differentially expressed genes; C-GO enrichment analysis of differentially expressed genes at different stages; D-KEGG Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes at different stages.

图 4 酸枣仁不同时期的差异基因分析及功能注释统计

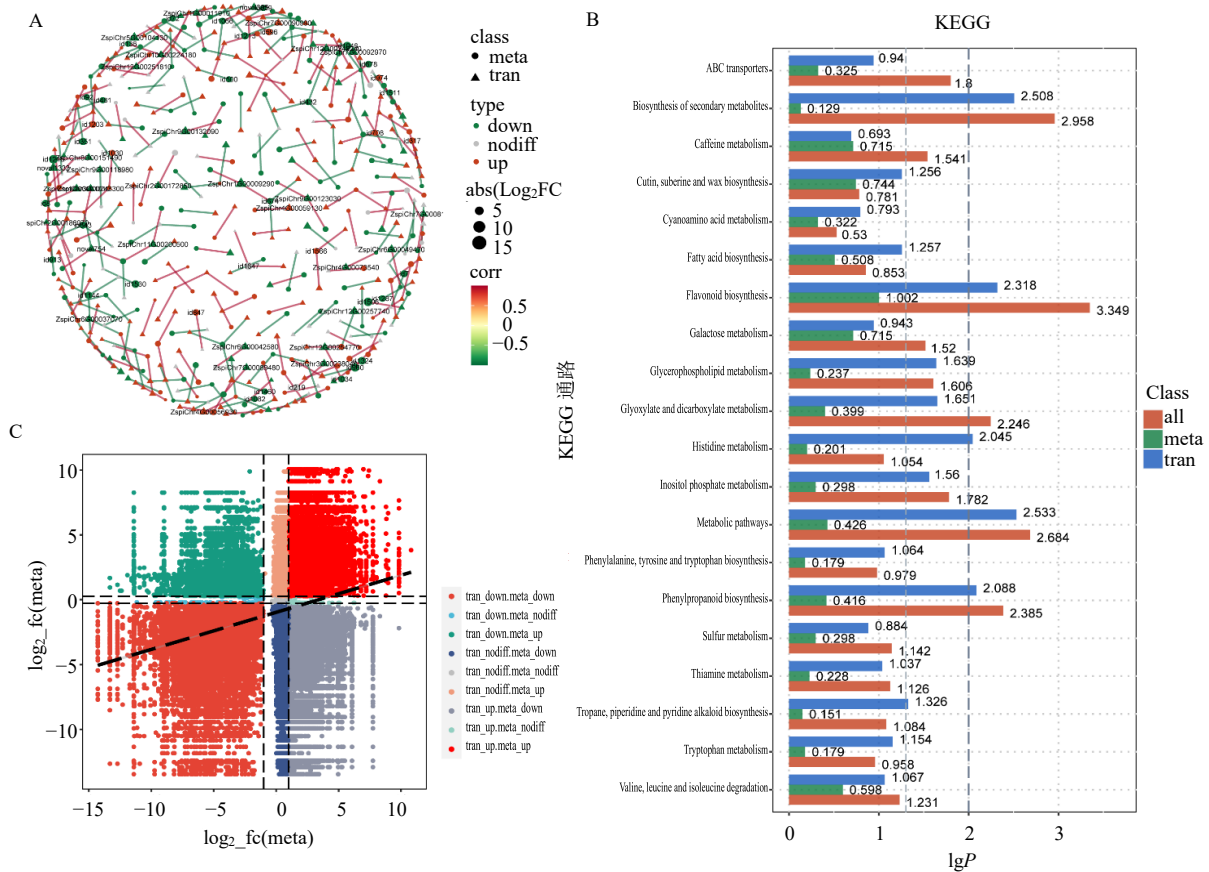
Fig. 4 Analysis of differential genes and functional annotation statistics of *Ziziphi Spinosae Semen* at different periods

生物合成 (13, 0.47%)、二萜 (diterpenoid) 生物合成 (10, 0.36%)、倍半萜和三萜 (sesquiterpenoid and triterpenoid) 生物合成 (8, 0.29%) 的基因, 结合酸枣仁皂苷 A 等三萜类化合物在成熟期有较高的积累量, 推测在成熟期有较高积累量的基因可能参与酸枣仁皂苷 A 的生物合成。

3.4 转录组学与代谢组学联合分析

基于酸枣仁同一发育时期的转录组与代谢组数据, 采用 R 软件 cor 函数计算差异基因与差异代谢物的 Pearson 相关系数, 以 $|r| > 0.8$ 且 $P < 0.05$ 筛选显著关联对, 进一步选取 $|r| \geq 0.99$ 的高

相关组合, 通过 Cytoscape 构建相关性网络图 (图 5-A), 直观呈现二者紧密关联模式。结合 KEGG 富集分析, 青果期与成熟期均显著富集黄酮类、皂苷类生物合成通路, 其中斯皮诺素在青果期相对积累量更高, 酸枣仁皂苷 A 在成熟期显著富集, 图 5-B 为各通路差异基因与代谢物数量分布条状图。此外, 九象限图 (图 5-C) 以黑色虚线划分为 9 个象限, 横轴、纵轴分别对应基因与代谢物 \log_2FC 值, 清晰展示 $|r| \geq 0.99$ 关联对的差异倍数协同特征, 印证了 2 种活性成分的时期特异性积累规律。



A-相关性网络图展示相关性关系, 其中, 点的大小代表 \log_2FC 的大小, 点的形状代表不同组学, 点的颜色代表上下调, 线的颜色代表线两端相关性的大小; B-KEGG 联合富集图展示富集结果, 横坐标表示富集 P 值得对数值; 纵坐标表示通路; 不同颜色表示不同组学, 靠左较为浅色的虚线为 P 值为 0.05, 靠右颜色较深的线为 P 值为 0.01; C-九象限图展示积累规律, 横纵坐标分别表示 2 种不同组学的 \log_2FC , 图上的点表示相互关联的 2 组学检出物。

A-Correlation network plot showing the correlation relationships. The node size represents the magnitude of \log_2FC , the node shape represents different omics, the node color represents up- or down-regulation, and the line color represents the correlation strength between the two connected nodes; B-Combined KEGG enrichment plot showing the enrichment results. The x-axis represents the negative logarithm of the enrichment P -value; the y-axis represents the pathway; different colors represent different omics. The light dashed line on the left indicates P value = 0.05, and the dark solid line on the right indicates P value = 0.01; C-Nine-quadrant plot showing the accumulation patterns. The x-axis and y-axis represent \log_2FC of two different omics, respectively. The dots in the plot represent the detected items of the two omics that are correlated with each other.

图 5 转录代谢的相关性分析、KEGG 富集分析和九象限图

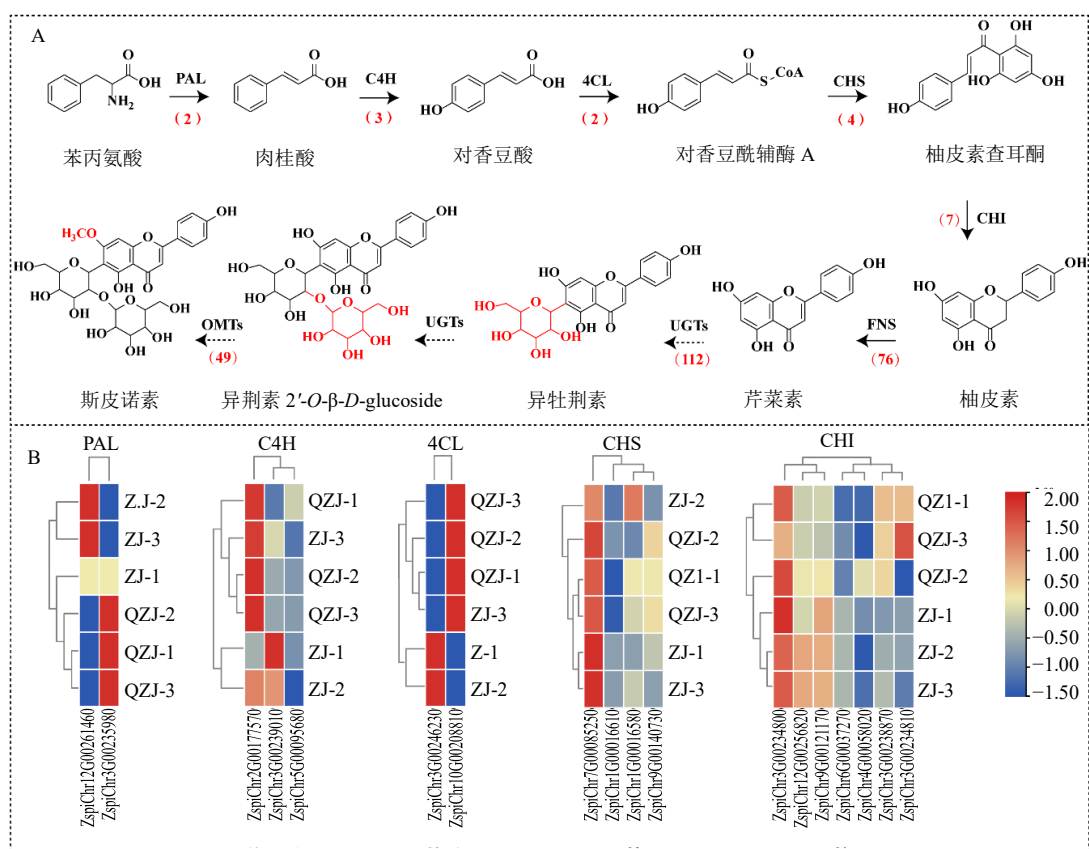
Fig. 5 Correlation analysis of transcriptional metabolism, KEGG enrichment analysis and nine-quadrant chart

3.5 斯皮诺素生物合成中候选基因筛选

3.5.1 斯皮诺素上游生物合成途径基因分析 斯皮诺素作为酸枣仁的主要活性成分之一，属于黄酮类化合物，具有改善神经系统疾病等功能^[19]。本研究通过分析酸枣仁转录组注释信息，筛选到 94 条可能参与酸枣仁斯皮诺素关键前体芹菜素合成的基因。筛选基因主要涉及苯丙烷代谢途径及黄酮类化合物合成的关键酶系：(1) 苯丙烷代谢上游途径中共鉴定获得编码 PAL、C4H 和 4CL 的 7 个基因 (2 个 PALs、3 个 C4Hs、2 个 4CLs)，这些基因可能协同催化苯丙氨酸通过苯丙烷途径生成对香豆酰辅酶 A (ρ -coumaroyl-CoA)^[37]。(2) 查耳酮合成阶段中，4 个 CHS 基因的鉴定表明其可能负责催化对香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 缩合生成柚皮素查耳酮

耳酮，该反应是黄酮骨架形成的限速步骤。(3) 后续修饰过程中，7 个 CHI 基因可能催化柚皮素查耳酮环化生成柚皮素，76 个 FNS 基因则可能通过氧化反应将柚皮素转化为芹菜素 (图 6-A)。值得注意的是，芹菜素作为斯皮诺素苷元，其生物合成效率直接影响最终活性成分的积累水平。进一步筛选候选基因，利用基因表达热图研究酸枣仁不同发育阶段候选基因的表达模式 (图 6-B)，结果显示基因在酸枣仁不同发育阶段的表达有差异，为后续参与斯皮诺素合成的 UGTs、O-MTs 等关键酶的筛选提供参考。

3.5.2 斯皮诺素下游生物合成途径基因筛选 斯皮诺素作为黄酮碳苷类化合物，其生物合成主要依赖苯丙素代谢通路，并通过多步酶促反应实现特征



A-实线箭头表示经实验证实的反应步骤，虚线箭头表示基于现有证据推测的反应过程，红色数字表示每种关键酶的候选基因数量；B-候选斯皮诺素生物合成基因的组织特异性表达，3 个重复的青果期和成熟期中基因表达的热图；颜色的强度反映了基因表达的水平，红色表示高表达，蓝色表示低表达。

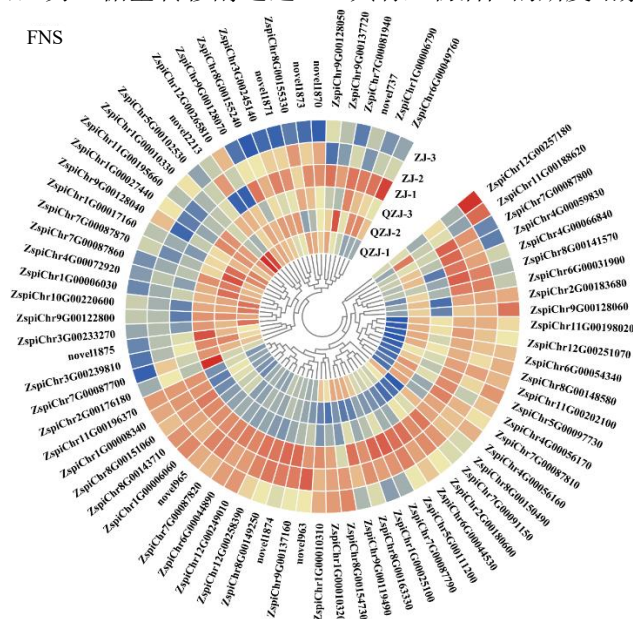
A-Solid arrows represent experimentally verified reaction steps, and dashed arrows represent reaction processes inferred based on existing evidence. Red numbers indicate the number of candidate genes for each key enzyme; B-Tissue-specific expression of candidate spinulosin biosynthesis genes; Heatmap of gene expression in three biological replicates of green fruit stage and mature stage; Color intensity reflects gene expression level, with red indicating high expression and blue indicating low expression.

图 6 斯皮诺素生物合成途径及候选基因

Fig. 6 Biosynthetic pathway and candidate genes of spinosin

性糖基化与甲基化修饰。结合斯皮诺素的骨架结构，推测其关键前体芹菜素首先在糖基转移酶的催化下，通过 C-糖苷键在芹菜素 C-6 位特异性引入葡萄糖基，形成异牡荆素。随后，另一糖基转移酶通过

O-糖苷键在异牡荆素 B 环的 2'-羟基位进一步连接 β-D-葡萄糖基，生成异牡荆素 2'-O-β-D-葡萄糖苷。最终，由 O-MT 对该中间体进行甲基化修饰，形成具有生物活性的斯皮诺素（图 7）。



3 个重复的 QZJ（青果期）和 ZJ（成熟期）中基因表达的热图。颜色的强度反映了基因表达的水平，红色表示高表达，蓝色表示低表达。
Heatmap of gene expression in three biological replicates of QZJ (green fruit stage) and ZJ (mature stage). Color intensity reflects gene expression level, with red indicating high expression and blue indicating low expression.

图 7 候选斯皮诺素生物合成途径中黄酮合酶的组织特异性表达

Fig. 7 Tissue-specific expression of FNS in candidate spinosin biosynthesis pathway

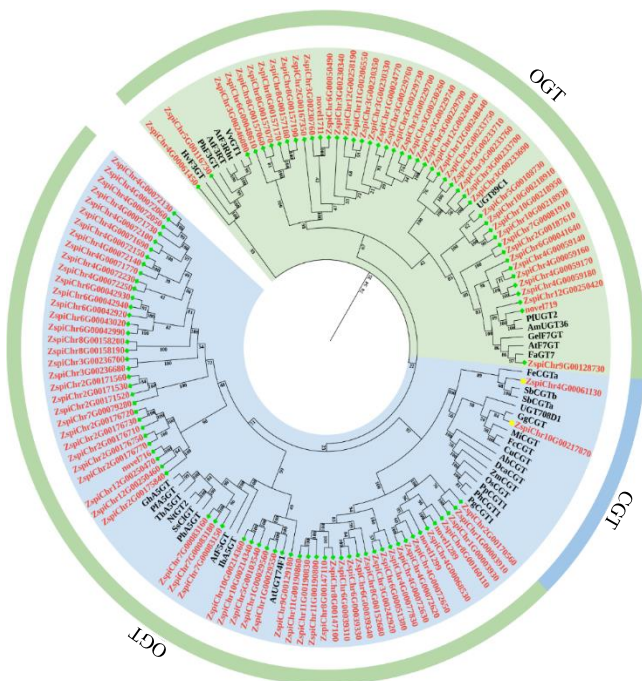
(1) 斯皮诺素生物合成候选 UGTs 筛选：糖基转移酶 (glycosyltransferases, GTs) 是生物体内广泛存在的一种进行糖基化反应的转移酶，能够将糖基从核苷酸糖供体转移到次生代谢物、激素类、蛋白类等化合物^[39]。根据糖苷键的类型，糖苷可分为 O-糖苷、C-糖苷、S-糖苷和 N-糖苷。其中，O-糖苷是数量最多的一类，其次是 C-糖苷^[40]。以尿苷二磷酸 (UDP) 激活的糖分子作为供体的 GTs 被称为 UDP-糖基转移酶 (UGTs) ^[41]。作为黄酮类生物合成途径的关键酶家族，UGTs 通过催化糖链延伸反应（如双糖、低聚糖合成），显著丰富了黄酮、三萜皂苷及生物碱等天然产物的结构多样性^[42]。结合斯皮诺素的碳苷结构特征，推测 CGTs 和 OGTs 可能参与斯皮诺素的糖基化修饰。通过整合转录组数据并过滤短序列及低质量序列，结合 Blast 功能验证和系统发育分析，共筛选到 2 条 CGTs 和 110 条 OGTs 基因（图 8）。对这些基因在不同时期中表达情况的热图分析显示，有 1 条 CGT 和 32 条 OGTs 基因在青果期高表达，推测以上基因与斯皮诺素的生物合成

有关（图 9）。

(2) 斯皮诺素生物合成中 OMTs 的筛选：结合斯皮诺素 C-7 位甲氧基结构特征，推测其生物合成的最后步骤可能涉及 OMTs 催化的羟基甲基化反应。根据催化位点不同，甲基转移酶可分为 O-MTs、N-MTs、C-MTs、S-MTs 及特殊类型，如无机砷甲基转移酶 (Cyt19) ^[32]。整合转录组数据并过滤短序列及低质量序列后，共筛选到 49 条注释为 OMTs 的候选基因。将其与鉴定功能的其他来源 O-MTs、N-MTs 和 C-MTs 进行系统发育分析，结果显示 O-MTs 与 N-MTs 和 C-MTs 形成明显分化，其中 20 条 O-MTs 与已报道的功能基因 O-MTs 关系较近（图 10）。结合热图分析确定候选基因的表达模式，进一步缩小候选基因筛选范围，发现有 12 条基因在青果期高表达，推测这 12 条 O-MTs 可能在斯皮诺素生物合成中发挥关键作用（图 11）。

3.6 酸枣仁皂苷 A 生物合成中候选基因筛选

3.6.1 酸枣仁皂苷 A 上游生物合成途径基因分析
酸枣仁皂苷是酸枣仁的主要活性成分之一，酸枣仁皂苷 A (jujuboside A) 是酸枣仁皂苷中发现较早且

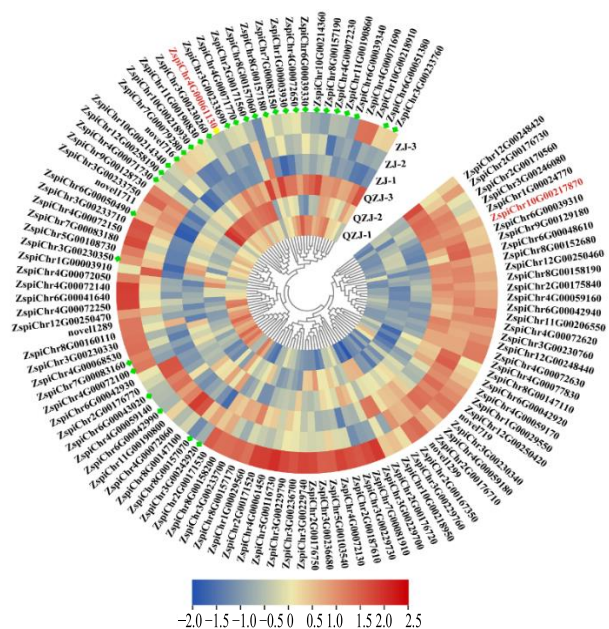


图中用于聚类的 *UGTs* 包括从转录组中筛选出的 112 个基因和来自不同物种的 35 个功能基因；红色字体为转录组中筛选出的 *UGTs*；使用 MEGA X 采用邻接法建树。

The *UGTs* used for phylogenetic analysis included 112 genes screened from the transcriptome and 35 functionally characterized genes from different species; *UGTs* identified from the transcriptome are labeled in red; The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method in MEGA X.

图 8 斯皮诺素生物合成途径中候选 *UGTs* 的系统发育分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis of candidate *UGTs* in spinosin biosynthetic pathway

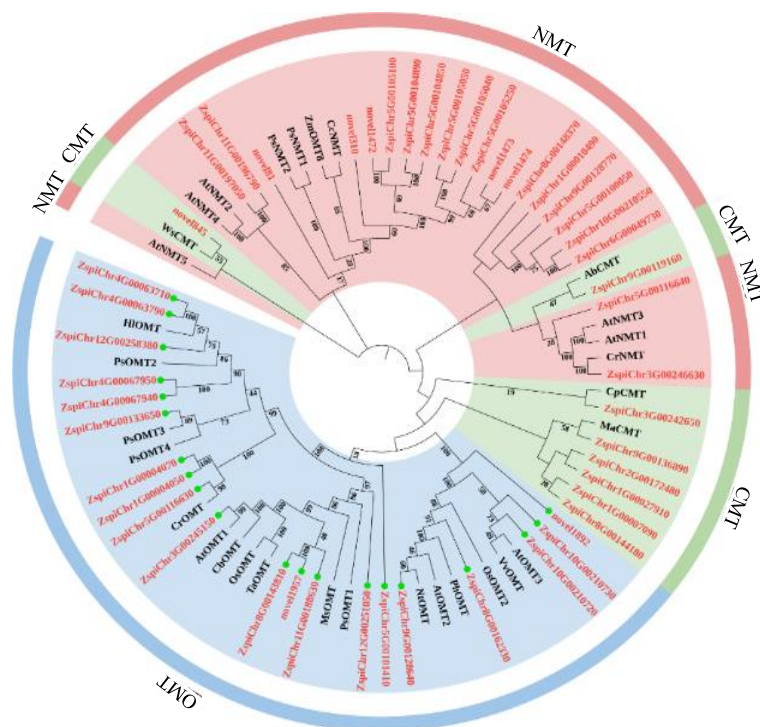


颜色的强度反映了基因表达的水平，红色表示高表达，蓝色表示低表达；以上基因为转录组中筛选出的 *CGTs* 和 *OGTs*，黄色圆圈为经热图进一步筛选出的关键 *CGT* 基因，绿色方块为经热图进一步筛选出的关键 *OGT* 基因。

Color intensity reflects gene expression level, with red indicating high expression and blue indicating low expression. The above genes are *CGTs* and *OGTs* screened from the transcriptome; Yellow circles represent key *CGT* genes further identified from the heatmap, and green squares represent key *OGT* genes further identified from the heatmap.

图 9 青果期和成熟期中候选 *UGTs* 基因表达的热图分析

Fig. 9 Heat map analysis of candidate *UGTs* gene expression in green fruit stage and mature stage



图中用于聚类的 MTs 包括从转录组中筛选出的 49 个基因和来自不同物种的 31 个功能基因；红色字体为转录组中筛选出的 OMTs；使用 MEGA X 采用邻接法建树。

The MTs used for clustering included 49 genes screened from the transcriptome and 31 functional genes from different species; OMTs screened from the transcriptome are labeled in red; The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method in MEGA X.

图 10 斯皮诺素生物合成途径中候选 OMTs 的系统发育分析

Fig. 10 Phylogenetic analysis of candidate OMTs in spinosin biosynthetic pathway

研究较为深入的单体成分之一，在镇静安神、改善睡眠、神经保护、抗氧化、抗炎等方面具有显著的药理活性^[42]。基于酸枣仁转录组数据注释结果，筛选到 43 条可能参与关键中间体 2,3-氧化鲨烯合成的基因。其中，16 个基因编码 MVA 途径 6 个关键酶，包括 2 个乙酰辅酶 A 酰基转移酶(acetyl-coenzyme A acetyltransferase, AACT)、7 个 3-羟基-3-甲基戊二酰辅 A 合成酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl- CoA synthase, HMGS)、3 个羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR)、2 个甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MVK)、1 个二氧磷基甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, PMK)、1 个甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (mevalonate diphosphate decarboxylase, MVD) 基因，催化乙酰辅酶 A 经甲羟戊酸转化为 IPP；11 个基因编码 MEP 途径 7 个关键酶，包括 3 个 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)、1 个 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)、3 个 2-甲基赤藓糖-4-磷

酸胞苷转移酶 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidylyltransferase, MCT)、1 个 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓糖激酶 (4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK)、1 个 2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合酶 (2-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, MDS)、1 个 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸合酶 (4-hydroxy-3-methyl-2-enyl-diphosphate synthase, HDS)、1 个 4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶 (4-hydroxy-3-methyl-2-enyl-diphosphate, HDR) 基因，通过 1 个异戊烯基二磷酸异构酶 (Isopentenyl diphosphate isomerase, IDI) 基因催化 IPP 与 DMAPP 之间的相互转化，之后 3 个 GPPS 和 3 个 FPPS 基因分别催化生成单萜前体 GPP 与倍半萜骨架 FPP，再由 1 个 SS 基因将 2 分子 FPP 缩合为角鲨烯 (Squalene)，最终 7 个 SE 基因催化其环氧化生成 2,3-氧化鲨烯^[43] (图 12)。基因表达热图分析表明，SE 主要在成熟期酸枣仁中表达，与酸枣仁皂苷 A 的积累一致，这为后续 OSC、P450、UGT 基因的筛选提供参考 (图 13)。

3.6.2 酸枣仁皂苷 A 下游生物合成途径基因筛选

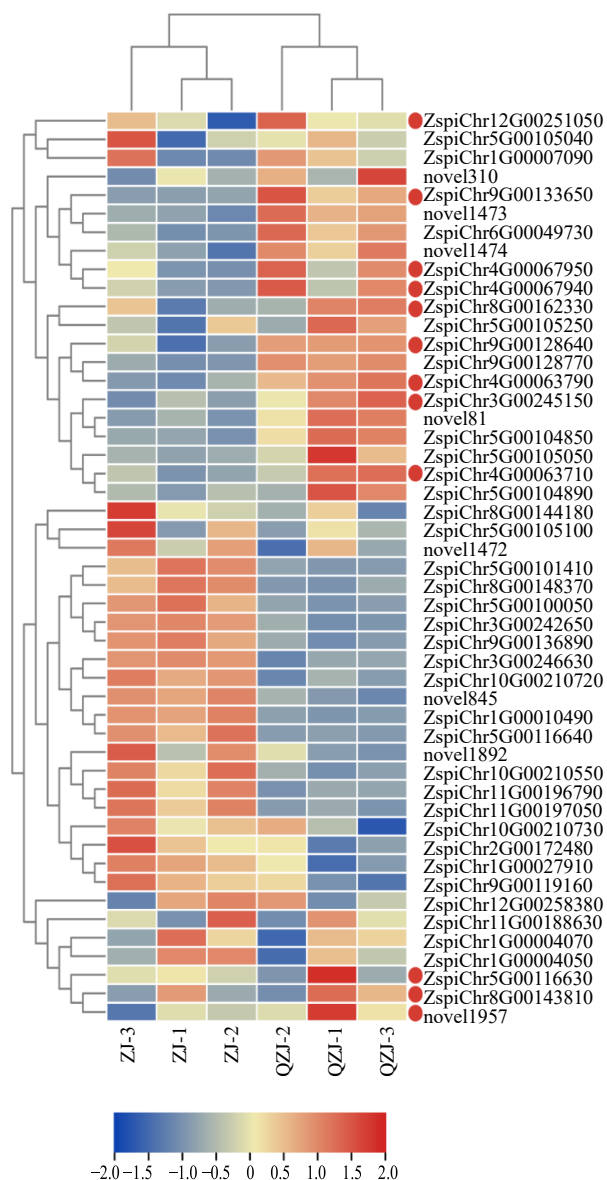


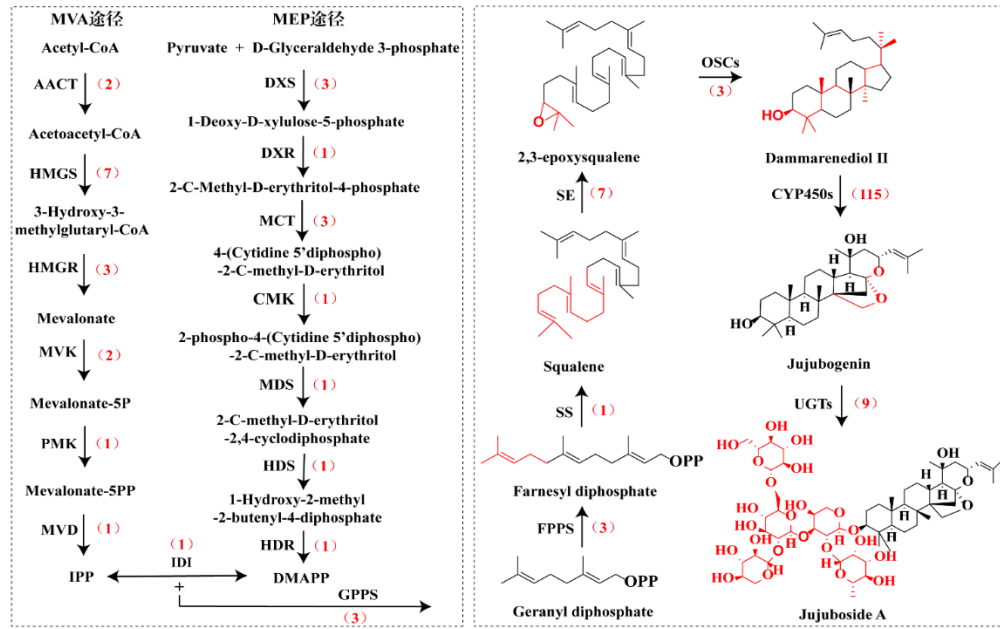
图 11 青果期和成熟期中 *OMTs* 基因表达的热图分析
Fig. 11 Heat map analysis of *OMTs* gene expression in green fruit stage and mature stage

(1)酸枣仁皂苷 A 生物合成 *OSCs* 基因筛选：
酸枣仁皂苷 A 属于达玛烷型四环三萜皂苷，推测其碳骨架结构由共同前体 *OSCs* 催化下形成达玛烯二醇。达玛烯二醇在 *CYP450s* 等氧化酶的作用下经过氧化修饰，形成具有特定氧化状态的四环三萜类中间体。最终，经 *UGTs* 进行糖基化修饰生成酸枣仁

皂苷 A。

OSCs 是三萜合成中的限速酶，催化 2,3-氧化鲨烯通过质子化、环化、重排和去质子化反应生成甾醇和三萜前体，形成具有不同碳骨架结构的三萜类化合物^[45]。Gan 等^[46]在人参中发现了 5 个类型的 *OSC*，分别为 α -香树素合成酶 (α -amyrin synthase, α -AS)、 β -香树素合成酶 (β -amyrin synthase, β -AS)、达玛烯二醇合成酶 (damadienol synthase, DS)、环阿屯醇合成酶 (cycloartenol synthase, CAS)、羽扇豆醇合成酶 (lupeol synthase, LUS)、葫芦二烯醇合成酶 (cucurbitadienol synthase, CDS)，在相关酶催化下分别生成羊毛甾醇、环阿屯烷醇、达玛烯二醇和葫芦烷型等四环三萜皂苷和 β -香树素和羽扇豆醇等五环三萜皂苷^[47-48]，这些化合物因其多样的生物活性和药用价值，在医药、食品和化妆品等行业中有着广泛的应用^[49]。通过整合酸枣仁转录组数据并结合 Blast 比对，排除短序列或不完整序列，共筛选得到 3 条 *OSCs* 基因 (图 14-A)。对这些基因在不同发育时期的表达情况进行热图分析，发现有 2 条基因在成熟期中表达水平较高 (图 14-B)，推测以上基因可能参与酸枣仁皂苷 A 的生物合成。

(2) 酸枣仁皂苷 A 生物合成中 *CYP450s* 基因筛选：细胞色素 P450 家族是一类以血红素为辅基的单加氧酶^[50]，作为关键的修饰酶，广泛参与植物次生代谢途径^[51]。大多数 *CYP450* 依赖氧化还原配偶体细胞色素 P450 氧化还原酶 (CPR) 将 2 个电子从 NAD (P) H 转移到血红素中心，激活分子氧以催化单加氧酶反应。通过羟基化、羧基化和环氧化等反应，*CYP450* 显著增加了植物天然产物的结构多样性和含量^[48]。基于酸枣仁皂苷 A 的结构特征，推测其可能参与四环三萜的生物合成途径，并催化达玛烯二醇的羟基化反应。Wang 等^[48]总结了三萜生物合成途径及通过微生物工程异源生产三萜的策略，证实了 *CYP716* 家族 (如 *CYP716A47*、*CYP716U1*) 参与催化达玛烯二醇反应。李冰等^[52]同样发现在人参皂苷的生物合成中，*CYP716A47* 和 *CYP716A53v2* 催化达玛烯二醇的羟基化反应。因此，推测 *CYP716* 家族基因可能在酸枣仁皂苷 A 的生物合成中发挥作用。通过对转录组数据分析并排除短序列或不完整序列，结合 Blast 比对结果，共筛选得到 115 条 *CYP450s* 基因。通过与已报道的不同物种 67 个 *CYP450s* 功能基因进行系统进化分析 (图 15)，

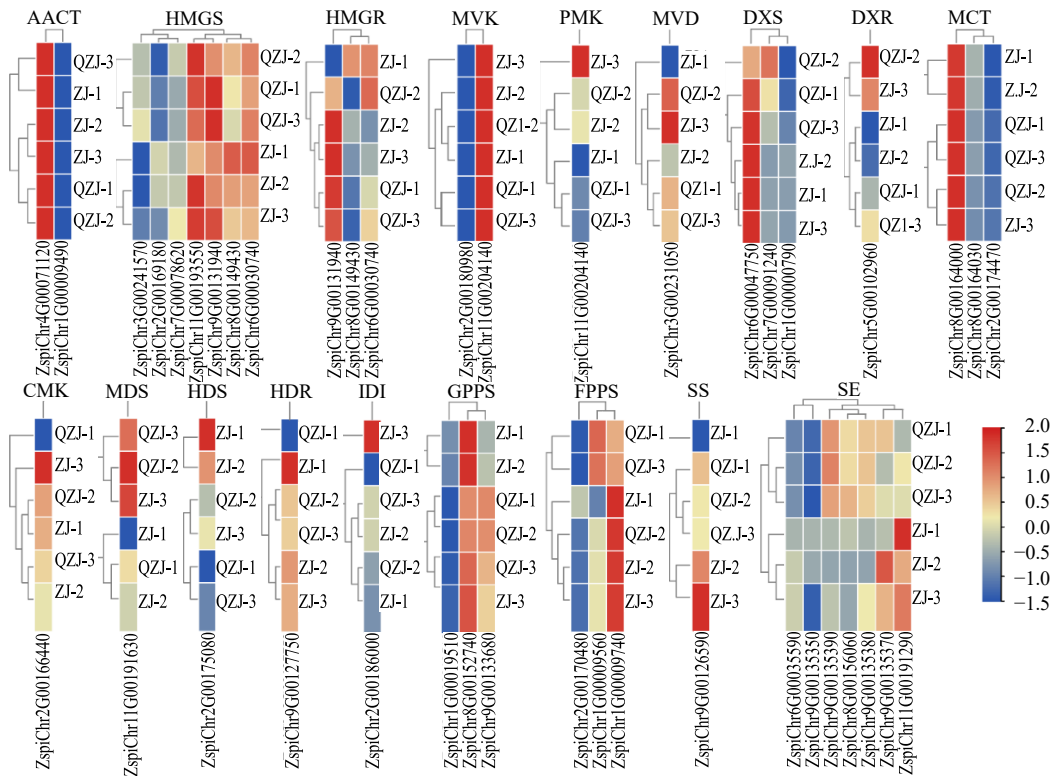


实线箭头表示经报道且实验证明的反应，虚线箭头表示推测的反应；红色数字表示每种关键酶的候选基因数量。

Solid arrows represent reported and experimentally verified reactions, while dashed arrows represent predicted reactions. Red numbers indicate the number of candidate genes for each key enzyme.

图 12 酸枣仁皂苷 A 生物合成途径

Fig. 12 Biosynthetic pathway of jujuboside A

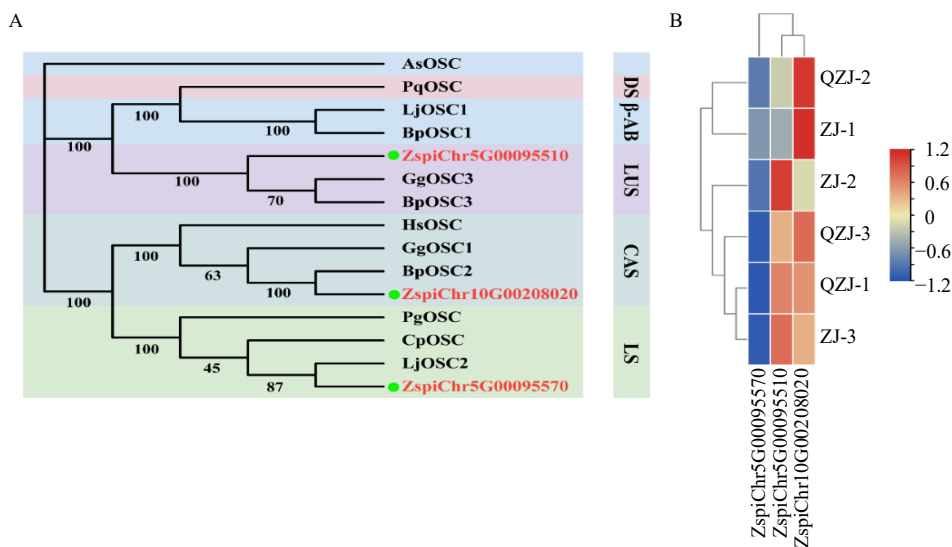


颜色的强度反映了基因表达的水平，红色表示高表达，蓝色表示低表达。

Color intensity reflects gene expression levels, with red indicating high expression and blue indicating low expression.

图 13 候选酸枣仁皂苷 A 生物合成基因表达热图分析

Fig. 13 Analysis of expression heat map of the candidate jujuboside A biosynthetic genes

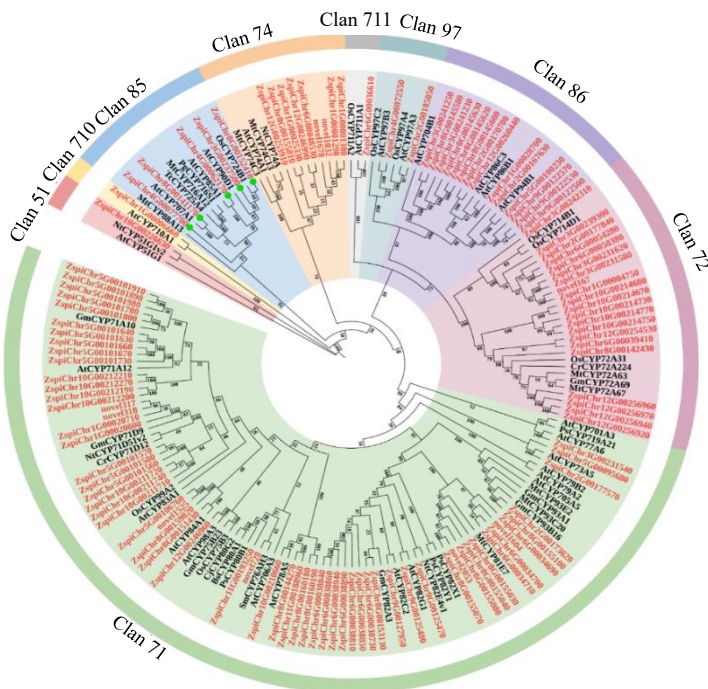


A-用于聚类的 OSCs 包括从转录组中筛选出的 3 个基因和来自不同物种的 12 个功能基因；红色字体为转录组中筛选出的 OSCs；使用 MEGA X 采用邻接法建树。B-青果期和成熟期中 OSCs 基因表达的热图分析；颜色的强度反映了基因表达的水平，红色表示高表达，蓝色表示低表达。红色字体为转录组中筛选出的 OSCs，红圈为经热图进一步筛选出的关键基因。

A-The OSCs used for clustering included three genes screened from the transcriptome and 12 functionally characterized genes from different species; OSCs identified from the transcriptome are labeled in red. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method in MEGA X; B-Heatmap analysis of OSCs gene expression in the green fruit stage and mature stage. Color intensity reflects gene expression level, with red indicating high expression and blue indicating low expression. OSCs screened from the transcriptome are labeled in red, and red circles represent key genes further identified from the heatmap.

图 14 酸枣仁皂苷 A 生物合成途径中候选 OSCs 的系统进化树和热图分析

Fig. 14 Phylogenetic tree and heat map analysis of candidate OSCs in jujuboside A biosynthetic pathway



图中用于聚类的 CYP450s 包括从转录组中筛选出的 115 个基因和来自不同物种的 67 个功能基因。红色字体为转录组中筛选出的 CYP450s。使用 MEGA X 采用邻接法建树。

A The CYP450s used for clustering included 115 genes screened from the transcriptome and 67 functionally characterized genes from different species. CYP450s identified from the transcriptome are labeled in red. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method in MEGA X.

图 15 酸枣仁皂苷 A 生物合成途径中候选 CYP450s 的系统发育分析

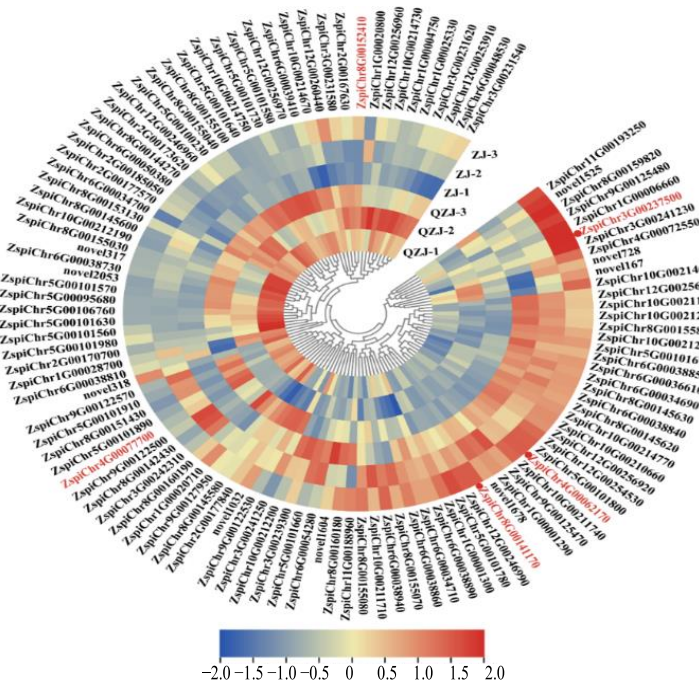
Fig. 15 Phylogenetic analysis of candidate CYP450s in jujuboside A biosynthetic pathway

发现酸枣仁中 *CYP450s* 基因归属于 9 个 CYP450 Clan, 其中 CYP716 家族属于 CYP85 Clan^[53], CYP85 Clan 包含 CYP88、CYP716、CYP90 等多个家族成员, 其中 CYP716 家族成员可催化皂苷类化合物的生物合成, 特别是催化达玛烯二醇的羟基化反应。在酸枣仁中共鉴定出 5 条 CYP716 亚家族基因, 推测这些基因可能参与酸枣仁皂苷 A 的生物合成途径。对这些基因在不同发育时期的表达水平进行热图分析, 结果显示有 3 个基因在成熟期的表达水平较高, 推测这 3 个 *CYP450s*

可能在酸枣仁皂苷 A 的生物合成中发挥关键作用 (图 16)。

3.7 RT-PCR 验证

为了验证斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 代谢途径中筛选出的关键候选基因的分析结果, 本研究从随机选取 8 个基因进行 RT-PCR 分析, 并设置 3 次生物学重复。RT-PCR 分析结果显示, 这 8 个基因在不同发育时期的表达水平变化趋势与转录组测序数据中的基因表达模式高度一致, 表明转录组数据准确, 筛选结果可靠 (图 17)。



颜色强度反映了基因表达水平, 红色表示高表达, 蓝色表示低表达。红色字体为转录组中筛选出的 *CYP450s*, 红圈为经热图进一步筛选出的关键基因。
Color intensity reflects gene expression level, with red indicating high expression and blue indicating low expression. *CYP450s* screened from the transcriptome are labeled in red, and red circles represent key genes further identified from the heatmap.

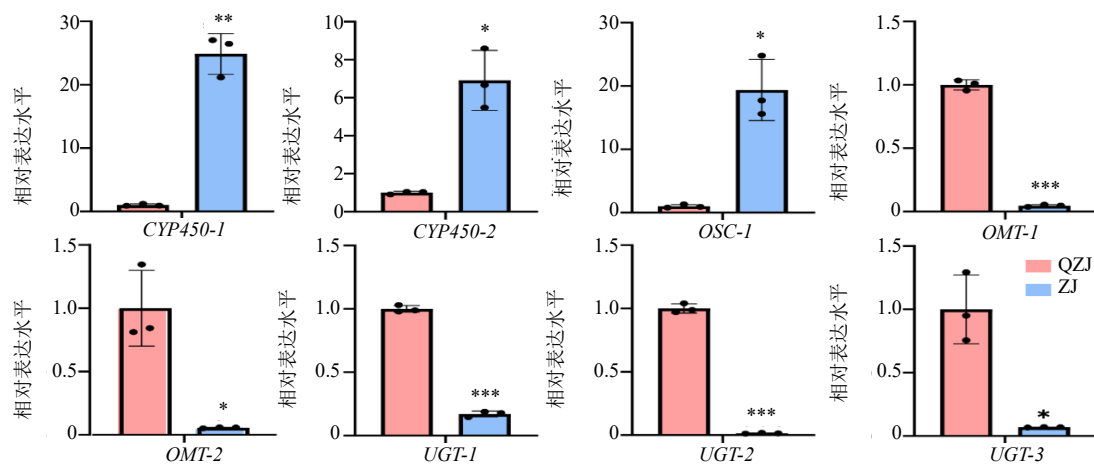
图 16 青果期和成熟期中 *CYP450s* 基因表达热图分析

Fig. 16 Analysis of heat map of *CYP450s* gene expression in green fruit stage and mature stage

4 讨论

酸枣仁作为传统中草药, 在临床中广泛用于失眠和焦虑的治疗^[54]。目前, 其主要活性成分斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的上游生物合成途径已初步解析, 但下游合成途径仍不明确, 且尚未从酸枣仁中鉴定出参与这两种化合物生物合成的关键基因。本研究选取不同发育时期的酸枣仁作为研究对象, 分别对青果期和成熟期样本进行转录组及代谢组测序。去除转录组数据冗余和相似序列后, 共鉴定得到 29 089 条 genes 和 20 961 条新转录本, 并筛选出 7 316 个差异表达基因, 丰富了酸枣仁转录组数据资

源。代谢组学分析共鉴定到 1 646 种代谢物, 明确斯皮诺素在青果期相对富集、酸枣仁皂苷 A 在成熟期显著积累的特征, 为差异基因筛选提供代谢层面依据。通过转录组与代谢组联合分析, 结合系统发育分析和基因表达热图, 进一步锁定与 2 种活性成分积累趋势匹配的候选基因, 共筛选出 45 条可能参与斯皮诺素生物合成的候选关键基因和 5 条可能参与酸枣仁皂苷 A 生物合成的候选关键基因, 包括 33 个 UGTs (1 个 CGT 和 32 个 OGTs)、12 个 OMTs、2 个 OSCs、3 个 CYP450s, 经 RT-qPCR 验证, 上述关键酶基因的表达模式与代谢物积累规律一致。候



CYP450-1、CYP450-2、OSC-1、OMT-1、OMT-2、UGT-1、UGT-2、UGT-3 为随机选取的 8 个关键候选基因，其与候选基因的对应关系为 CYP450-1: ZspiChr3G00237500、CYP450-2: ZspiChr4G00062170、OSC-1: ZspiChr5G00095510、OMT-1: ZspiChr9G00128640、OMT-2: ZspiChr4G00063710、UGT-1: ZspiChr3G00230260、UGT-2: ZspiChr12G00258190、UGT-3: ZspiChr4G00061130。黑点为不同时期设置的 3 个重复样本，* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

CYP450-1, CYP450-2, OSC-1, OMT-1, OMT-2, UGT-1, UGT-2 and UGT-3 are eight randomly selected key candidate genes. Their corresponding gene IDs are as follows: CYP450-1: ZspiChr3G00237500; CYP450-2: ZspiChr4G00062170; OSC-1: ZspiChr5G00095510; OMT-1: ZspiChr9G00128640; OMT-2: ZspiChr4G00063710; UGT-1: ZspiChr3G00230260; UGT-2: ZspiChr12G00258190; UGT-3: ZspiChr4G00061130. Black dots represent three biological replicates at different stages. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

图 17 斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 生物合成关键基因 RT-PCR 验证

Fig. 17 RT-PCR validation of key genes involved in biosynthesis of spinosin and jujuboside A

选关键基因的挖掘为后续 2 种活性成分生物合成途径的完整解析及功能基因验证奠定基础，后续将通过体外酶活与体内基因沉默/过表达验证核心基因功能、结合中间体追踪完善合成途径，为酸枣仁活性成分机制研究及资源可持续利用提供支撑。

近年来，代谢组学技术因其高分辨率和高灵敏度的技术优势，在中药活性成分的检测分析领域得到广泛应用^[55]。其中，超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术因具有分离效率高、检测限低、分析速度快等特点，已成为药用植物次生代谢产物鉴定与差异分析的关键技术手段。本研究通过代谢组学分析，在酸枣仁不同生长时期样本中成功鉴定出 92 种显著差异的黄酮类代谢物和 57 种显著差异的萜类代谢物，进一步丰富了酸枣仁化学成分数据库，为后续活性成分生物合成机制研究提供了物质基础。本研究重点关注了酸枣仁核心活性成分斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 在不同时期的含量差异，发现斯皮诺素在青果期相对积累量较高，而酸枣仁皂苷 A 则在成熟期样品中相对积累量更高，该结果与 Ma 等^[56]的研究结果具有一致性，其研究同样发现斯皮诺素在酸枣仁发育过程中呈现青果期含量高于成熟期的差异特征。然而，Zhao 等^[35]采用基质辅助激光解吸电离-质谱成像技术 (MALDI-MSI) 发

现，随着酸枣植株生长发育，斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的含量均呈现持续增长的趋势，且通过组织定位分析明确斯皮诺素主要集中在胚根和胚乳部位，酸枣仁皂苷 A 主要集中在胚根部位。本研究与 Zhao 等^[34]在斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 积累特征上的差异，核心源于实验设计与技术方法的不同：取样上，本研究聚焦酸枣仁完整药用部位，以 3 个生物学重复、随机取样及平行样验证确保全组织总量检测稳定性，与 Zhao 等“组织细分定位”的研究目标形成互补；检测上，UPLC-MS/MS 经方法学验证，侧重总量定量，MALDI-MSI 侧重原位分布，二者均具科学性。综上，本研究在药用部位总量分析层面数据可靠，后续可结合分组织取样完善研究。

基于代谢组和转录组的比较组学研究，为揭示植物代谢物的生物合成机制提供了有效途径^[55]。Xu 等^[57]运用比较组学分析，从延胡索中挖掘出 10 种可能具有黄连碱 O-MTs 活性的基因，进一步完善了延胡索中苯基异喹啉类化合物的生物合成途径。在另一项研究中，He 等^[58]借助比较组学方法，证实了 CYP716 和 CYP72 家族在齐墩果烷型三萜类化合物生物合成中的关键作用，并建立了一种高效生产常春藤碳苷及其衍生物的方法。本研究聚焦于酸枣仁的主要活性成分斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的生物

合成途径,这两种活性成分因其显著的镇静抗炎特性而备受关注^[59]。研究推测,UGTs和MTs介导的糖基化和甲基化反应在斯皮诺素的生物合成中发挥重要作用,而OSCs和CYP450s参与的环化和氧化反应则是酸枣仁皂苷A生物合成的关键环节。CYP450s作为最大的酶蛋白家族之一,在植物次生代谢反应过程中发挥重要作用,能够催化羟基化、碳碳偶联、羧化、脱甲基等多种反应,参与萜类、苯丙烷类、生物碱等化合物的生物合成^[60]。Zhang等^[48]研究表明,CYP716家族基因在催化达玛烯二醇的羟基化反应中具有关键作用。因此,本研究结合BLAST比对和系统发育分析,筛选出5条CYP716家族候选基因,推测其可能以达玛烯二醇为底物,催化生成酸枣仁皂苷A。结合代谢组数据和热图分析,最终确定3条重点候选基因,推测其可能参与酸枣仁皂苷A的生物合成过程。采用相同策略,本研究还筛选出33条UGTs基因、12条OMTs基因、2条OSCs基因和3条CYP450s基因。比较组学方法的应用缩小了候选基因筛选范围,为后续功能基因验证提供了参考,也为解析斯皮诺素和酸枣仁皂苷A的生物合成途径奠定了基础^[61]。

综上所述,本研究通过比较组学分析,深入探究了斯皮诺素和酸枣仁皂苷A生物合成途径中的关键候选基因,为酸枣仁中关键功能基因的克隆及功能表征提供了重要参考,也为其他药用植物活性成分生物合成途径的解析和关键基因的筛选提供了借鉴思路。未来研究将综合运用基因组测序、同位素示踪技术及酶工程等方法,进一步挖掘功能基因并阐明代谢通路,以期完整解析酸枣仁中不同活性成分的生物合成机制。

志谢:中国林业科学研究院经济林研究所刁松锋和杜改改博士帮助采集样本。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 253.
- [2] 杨丽萍, 黄嘉禧, 邓雨娟. 酸枣仁皂苷A的药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(1): 90-97.
- [3] 石宇浩, 南易, 郑伟, 等. 酸枣仁种皮和种仁化学成分的定性及半定量分析 [J]. 色谱, 2024, 42(3): 234-244.
- [4] 温子帅, 孙会改, 李新蕊, 等. 基于转录组分析酸枣仁斯皮诺素生物合成途径的相关基因 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1268-1277.
- [5] 琚思伟. 陕北黄河沿岸酸枣种源研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [6] 解玉军, 李泽, 崔小芳, 等. 酸枣化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1269-1275.
- [7] 林漪清, 黄秋强. 酸枣仁改善睡眠质量的研究进展 [J]. 世界睡眠医学杂志, 2021, 8(9): 1673-1674.
- [8] 李会涛. 酸枣仁皂苷类成分分析及其抗抑郁机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [9] Guo Y, Wei F Y, Lv Y, et al. Spinosin improves anxiety disorders in mice with chronic restraint stress via the ERK1/2-CREB-BDNF pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143(Pt 2): 113517.
- [10] Zhang M, Liu J R, Zhang Y Q, et al. *Ziziphi spinosae semen*: A natural herb resource for treating neurological disorders [J]. *Curr Top Med Chem*, 2022, 22(17): 1379-1391.
- [11] Luo H, Sun S J, Wang Y, et al. Revealing the sedative-hypnotic effect of the extracts of herb pair *Semen Ziziphi spinosae* and *Radix Polygalae* and related mechanisms through experiments and metabolomics approach [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 206.
- [12] Liu M H, Jin H X, Song Z, et al. Phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic and toxicological characteristics of *Ziziphi Spinosae Semen*: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1504009.
- [13] 甘家霞, 李豆豆, 苏金瑞, 等. 酸枣仁产业现状和发展建议 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(8): 1332-1336.
- [14] 曲彤, 耿飞飞, 李宁, 等. 酸枣仁的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 药学前沿, 2024, 28(9): 98-108.
- [15] Zhu C H, Zhang Z R, Wang S T, et al. Study on the mechanism of *Gastrodiae Rhizoma*, *Lycii Fructus*, and *Ziziphi Spinosae Semen* in sedation and tranquillising mind [J]. *Mol Divers*, 2024, 28(5): 3279-3294.
- [16] Xia J, Cai M, Xu B, et al. Comparative study on sedative and hypnotic effects of crude and parched *semen ziziphi spinosae*: Integration of network pharmacology and *in vivo* pharmacological evaluation [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2025, 21(5): 573-586.
- [17] 温子帅. 基于转录组学分析酸枣仁活性成分的生物合成研究 [D]. 石家庄: 河北中医学院, 2020.
- [18] Wan X, Fu R, Zhu W H, et al. Research on the identification of *Ziziphi Spinosae semen* and its adulterants based on the fusion of hyperspectral technology and transfer learning [J]. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2026, 346: 126907.
- [19] Kuang X L, She G S, Ma T, et al. The pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of spinosin: A mini review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 938395.

- [20] Lin G, Li W B, Hong W B, *et al.* Spinosin inhibits activated hepatic stellate cell to attenuate liver fibrosis by targeting Nur77/ASK1/p38 MAPK signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 966: 176270.
- [21] Bi F H, Wang Z H, Guo Y J, *et al.* A combination of magnoflorine and spinosin improves the antidepressant effects on CUMS mouse model [J]. *Curr Drug Metab*, 2024, 25(1): 71-80.
- [22] Cai M D, Jung I, Kwon H, *et al.* Spinosin attenuates Alzheimer's disease-associated synaptic dysfunction via regulation of plasmin activity [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2020, 28(2): 131-136.
- [23] 李旭, 和建政, 陈彻, 等. 酸枣仁镇静催眠活性成分及药理作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(2): 23-31.
- [24] 王翠, 肖洪贺, 闻彩名, 等. 基于转录组学探讨酸枣仁皂苷 A 改善阿尔茨海默病小鼠认知功能障碍的机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8094-8104.
- [25] Zhang W J, Cheng Q, Yin L X, *et al.* Jujuboside A through YY1/CYP2E1 signaling alleviated type 2 diabetes-associated fatty liver disease by ameliorating hepatic lipid accumulation, inflammation, and oxidative stress [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 400: 111157.
- [26] Zhang M, Qian C, Zheng Z G, *et al.* Jujuboside A promotes A β clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPAR γ pathway [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4262-4278.
- [27] Liu W X, Feng Y, Yu S H, *et al.* The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12824.
- [28] 周金龙, 廖海兵, 毛玉华, 等. 黄酮类化合物的生物合成技术研究进展 [J]. *生物化工*, 2024, 10(6): 185-189.
- [29] 徐圆圆, 陈仲, 贾黎明, 等. 植物三萜皂苷生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(5): 525-555.
- [30] Ma C, Lin Y, Yin J J, *et al.* Phylogenetic analysis and expression patterns of triterpenoid saponin biosynthesis genes in 19 Araliaceae plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(7): 3439.
- [31] Li G L, Tang Z S, Song Z X, *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveal the molecular and metabolic basis of flavonoids in Chinese sour jujube fruits in different harvest times [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2024, 209: 112685.
- [32] Liu X Y, Chen J C, Ma R, *et al.* Metabolic profiling and transcriptome analysis of *Sinomenium acutum* provide insights into the biosynthesis of structurally diverse benzyloquinoline alkaloids [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 5877.
- [33] 宫少达. 野葛基因组的组装注释及多组学分析 [D]. 南宁: 广西大学, 2024.
- [34] Zhao M W, Liu Z, Wang J M, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging analysis revealed the spatial distribution of metabolites during *Ziziphi Spinosae Semen* at different growth periods [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1510310.
- [35] Li K, Chen R H, Abudoukayoumu A, *et al.* Haplotype-resolved T2T reference genomes for wild and domesticated accessions shed new insights into the domestication of jujube [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(5): uhae071.
- [36] He S M, Song W L, Cong K, *et al.* Identification of candidate genes involved in isoquinoline alkaloids biosynthesis in *Dactylicapnos scandens* by transcriptome analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9119.
- [37] Yang Y X, Cai Q H, Yang Y B, *et al.* Transcriptomics and metabolomics reveal biosynthetic pathways and regulatory mechanisms of phenylpropanes in different ploidy of *Capsicum frutescens* [J]. *Plants*, 2024, 13(23): 3393.
- [38] 欧阳宁, 吴健. 芳香族化合物合成生物学及在生物育种中的研究进展 [J]. *华南农业大学学报*, 2023, 44(5): 679-689.
- [39] 于安东, 刘琳, 龙瑞才, 等. 植物 UDP-糖基转移酶 (UGT) 的功能及应用前景 [J]. *植物生理学报*, 2022, 58(4): 631-642.
- [40] Zhang Y Q, Zhang M, Wang Z L, *et al.* Advances in plant-derived C-glycosides: Phytochemistry, bioactivities, and biotechnological production [J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 60: 108030.
- [41] Wei W, Wang P P, Wei Y J, *et al.* Characterization of *Panax ginseng* UDP-glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rh1 in metabolically engineered yeasts [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1412-1424.
- [42] 杨润, 段绍凤, 向贵生, 等. 川续断糖基转移酶的生物信息学分析、克隆及原核表达 [J]. *分子植物育种*, 2025, 24(33): 1-14.
- [43] 王佳璇, 孙嘉萍, 徐菁, 等. 酸枣仁皂苷 A 通过调节内源性凋亡及 EMT 相关信号通路抑制人前列腺癌细胞活性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2025, 33(7): 1101-1108.
- [44] Xu Y Y, Chen Z, Jia L M, *et al.* Advances in understanding of the biosynthetic pathway and regulatory mechanism of triterpenoid saponins in plants [J]. *Sci Sin-Vitae*, 2021, 51(5): 525-555.
- [45] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 等. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展 [J]. *生物工程学报*, 2022,

- 38(2): 443-459.
- [46] Gan Y H, Li Z P, Fan B L, *et al.* De novo biosynthesis of a polyene-type ginsenoside precursor dammaradienol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *ACS Synth Biol*, 2024, 13(12): 4015-4026.
- [47] Gu X P, Yang L L, Wan J, *et al.* Genome-wide identification of BcMYB in *Bupleurum Chinense* DC. and its regulatory roles in saikosaponins synthesis under temperature stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 25(1): 1577.
- [48] Zhang F, Hao X M, Liu J, *et al.* Herbal multiomics provide insights into gene discovery and bioproduction of triterpenoids by engineered microbes [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(1): 47-65.
- [49] 王宝慧, 宋诗娟, 郭旭, 等. 黄芪 OSC 超基因家族的鉴定及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2025, 23(5): 1666-1674.
- [50] 陈娜, 谢瑞, 安梅琳, 等. 青风藤碱合成酶基因 SinSyn 克隆及表达[J]. *分子植物育种*, 2023, 66(34): 1-11.
- [51] Liu X Y, Jiao X, Cheng Y T, *et al.* Structure-function analysis of CYP719As involved in methylenedioxy bridge-formation in the biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloids and its *de novo* production [J]. *Microb Cell Fact*, 2023, 22(1): 23.
- [52] 李冰, 张传波, 宋凯, 等. 生物合成稀有人参皂苷的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(6): 71-88.
- [53] Hansen C C, Nelson D R, Møller B L, *et al.* Plant cytochrome P450 plasticity and evolution [J]. *Mol Plant*, 2021, 14(8): 1244-1265.
- [54] Kong Y X, He S L, Ma D L, *et al.* Chemical composition determination and transcriptomic analyses provide insight into the differences between wild and grafted *Semen Ziziphi Spinosae* [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 978.
- [55] Tian W, Liu L D, Song Z X, *et al.* Integrated data reveal the flavonoid biosynthesis metabolic pathway in *Semen Ziziphi Spinosae* using transcriptomic and metabolomic [J]. *Phyton*, 2023, 92(2): 369-382.
- [56] Ma D L, Zhao M W, Guo H C, *et al.* Spatial distribution of metabolites in processing *Ziziphi Spinosae Semen* as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 15263.
- [57] Xu D Q, Lin H F, Tang Y P, *et al.* Integration of full-length transcriptomics and targeted metabolomics to identify benzyloisoquinoline alkaloid biosynthetic genes in *Corydalis yanhusuo* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 16.
- [58] Xu Y Y, Zhao G C, Ji X Q, *et al.* Metabolome and transcriptome analysis reveals the transcriptional regulatory mechanism of triterpenoid saponin biosynthesis in soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(23): 7095-7109.
- [59] He S R, Zhao C B, Zhang J X, *et al.* Botanical and traditional uses and phytochemical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological characteristics of ziziphi spinosae semen: A review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5861821.
- [60] 刘秀玉, 罗凌龙, 马莹, 等. 植物天然产物途径创建 [J]. *药学学报*, 2021, 56(12): 3285-3299.
- [61] 郭文鼎, 胡志敏, 卜俊玲, 等. 基于芍药转录组挖掘芍药苷生物合成相关基因 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(16): 4347-4357.

[责任编辑 时圣明]