

• 药材与资源 •

基于代谢-转录组学对近野生铁皮石斛石生和木生栽培模式与药效物质累积规律的研究

尹阿顺¹, 李梦妮², 盛小宽², 白泽榕¹, 廖 薇¹, 陆榆菲¹, 钱晨欣¹, 陈 婷¹, 汪紫莹¹, 詹志来³, 梁宗锁¹, 张晓丹^{1*}

1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018

2. 浙江乐清市农业农村局 石斛产业管理科, 浙江 温州 325600

3. 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** 研究不同栽培基质对近野生铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 药效成分积累的调控机制, 为其品质差异的分子基础及栽培基质优化提供依据。**方法** 以石生和木生栽培基质的铁皮石斛样品为材料, 采用非靶向代谢组学鉴定并比较 2 种栽培模式下次生代谢物谱以及通过转录组学测序用于筛选差异表达基因, 并结合 KEGG 等数据库进行通路富集分析, 并与代谢物变化进行整合分析。**结果** 代谢组共鉴定 2 878 个代谢物, 其中 354 个在 2 种模式间显著差异, 主要涉及苯丙素类、类黄酮、生物碱、脂质及芳香族氨基酸等物质。石生样品中黄酮类、生物碱类及部分氨基酸类代谢物整体积累水平较高, 木生样品中脂质及类固醇类物质相对富集。转录组测序筛选出 2 966 个差异表达基因, KEGG 富集分析显示苯丙素类生物合成 (ko00940)、类黄酮生物合成 (ko00941)、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成 (ko00400) 及托品烷、哌啶和吡啶生物碱生物合成 (ko00960) 等通路显著分化。类黄酮合成关键酶[如苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、类黄酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)]基因在石生样品中上调表达, 与相关代谢物积累趋势一致。联合分析表明, 栽培基质可能通过调控苯丙素-类黄酮-生物碱代谢相关基因表达, 改变代谢通量分配方向, 形成不同代谢表型。**结论** 栽培基质通过调控苯丙素、类黄酮及生物碱等相关代谢通路基因的表达, 影响铁皮石斛活性成分的种类与积累水平, 从而造成石生与木生栽培品质量的差异。系统阐明了铁皮石斛品质差异的分子机制, 为栽培基质优化和药材分级利用提供理论依据。

关键词: 铁皮石斛; 非靶向代谢组学; 转录组学; 栽培基质; 药效成分

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)19-7787-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.022

Metabolomics and transcriptomics-based exploration of stone-/wood-based cultivation patterns of near-wild *Dendrobium officinale* and accumulation patterns of pharmacologically active substances

YIN Ashun¹, LI Mengni², SHENG Xiaokuan², BAI Zerong¹, LIAO Wei¹, LU Yufei¹, QIAN Chenxin¹, CHEN Ting¹, WANG Ziyang¹, ZHAN Zhilai³, LIANG Zongsuo¹, ZHANG Xiaodan¹

1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. *Dendrobium* Industry Management Section, Zhejiang Yueqing Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Wenzhou 325600, China

3. State Key Laboratory for Quality Assurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanisms by which different cultivation substrates influence the accumulation of pharmacologically active components in near-wild Tiepishihu (*Dendrobium officinale*), and provide a basis for elucidating the molecular mechanisms underlying quality differences and for optimizing cultivation substrates. **Methods** *D. officinale* samples grown on stone-based and wood-based substrates were used as experimental materials. Non-targeted metabolomics was employed to identify and compare the secondary metabolite profiles under the two cultivation modes, while transcriptome sequencing was conducted to screen differentially

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目 (U25A20163); 2025 年浙江省大学生科技创新活动计划 (2025R406A037)

作者简介: 尹阿顺, 硕士研究生, 研究方向为铁皮石斛药效成分研究。E-mail: yas123yas123@126.com

*通信作者: 张晓丹, 副教授, 从事药食同源植物研究。E-mail: zhangxiaodanzstu@163.com

expressed genes (DEGs). KEGG and other databases were used for pathway enrichment analysis, which was then integrated with metabolite variation data. **Results** A total of 2 878 metabolites were identified by metabolomics, of which 354 showed significant differences between the two cultivation modes. These metabolites were mainly involved in phenylpropanoids, flavonoids, alkaloids, lipids, and aromatic amino acids. Flavonoids, alkaloids, and certain amino acid-derived metabolites exhibited overall higher accumulation in stone-grown samples, whereas lipids and steroid-related compounds were relatively enriched in wood-grown samples. Transcriptome sequencing identified 2 966 DEGs. KEGG enrichment analysis indicated significant differentiation in pathways including phenylpropanoid biosynthesis (ko00940), flavonoid biosynthesis (ko00941), phenylalanine/tyrosine/tryptophan biosynthesis (ko00400), and tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis (ko00960). Genes encoding key enzymes in flavonoid biosynthesis [such as phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3-hydroxylase (F3H)] were upregulated in stone-grown samples, consistent with the accumulation patterns of the corresponding metabolites. Integrated analysis suggested that cultivation substrates may regulate the expression of genes involved in phenylpropanoid-flavonoid-alkaloid metabolism, thereby altering the direction of metabolic flux allocation and ultimately shaping distinct metabolic phenotypes. **Conclusion** Cultivation substrates influence the types and accumulation levels of active constituents in *D. officinale* by regulating the expression of genes in phenylpropanoid, flavonoid, and alkaloid biosynthetic pathways, resulting in quality differences between stone-grown and wood-grown materials. This study systematically elucidates the molecular mechanisms underlying quality variation in *D. officinale* and provides a theoretical basis for cultivation substrate optimization and graded utilization of medicinal materials.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura & Migo; non-targeted metabolomics; transcriptomics; cultivation substrate; pharmacologically active components

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura & Migo, 兰科石斛属多年生草本植物, 素有“中华仙草”之美誉。现代药理研究表明, 其主要的活性成分如多糖、生物碱、联苳类、黄酮类及氨基酸等, 具有显著的增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化、降血糖及护肝等多重药理功效^[1]。这些成分共同构成了铁皮石斛多方面的药理活性基础, 其中铁皮石斛多糖被认为是其最重要的免疫调节成分, 具有显著的增强机体免疫力、抗氧化、抗疲劳以及促进肠道健康等功效; 铁皮石斛生物碱类化合物(如毛兰素、鼓槌石斛素等), 展现出显著的抗肿瘤活性, 能抑制多种癌细胞的增殖和转移, 并具有镇痛作用^[2]; 联苳类化合物(如石斛酚、鼓槌联苳等), 具有强效的抗炎、抗氧化、保护神经元以及心血管保护等作用; 黄酮类化合物(如柚皮素、芹菜素及其糖苷等), 则展现出显著的抗氧化、抗炎、降血糖、改善胰岛素抵抗以及保护肝脏等生物活性^[3]。随着野生资源日趋枯竭, 人工栽培已成为铁皮石斛产业发展的主要方式, 但不同栽培基质下药材质量差异显著, 其形成机制仍有待深入解析。

在长期生产实践与传统本草经验中, 人们已注意到铁皮石斛生长基质差异对品质的影响。本草古籍^[4-5]记载中提到: “亦有生药木上者, 名木斛, 不堪用。其茎至虚, 长大而色浅, 不入丸散, 用之无功。”这一表述源自古代本草学对石斛 *Dendrobium* 药材的品质分级观念, 认为附生于树木上的铁皮石斛(木斛)相比附生于岩石上的铁皮石斛(石斛)品质低劣, 不宜药用。然而, 现代研究揭示了一个于此相悖的事实: 石斛属

植物本身是典型的附生植物, 其附生基质(树木、岩石等)对化学成分积累有显著影响, 但并不意味着“木生”就等于“不堪用”。石生铁皮石斛附生于岩石或石壁, 根系直接接触矿质基质, 环境相对贫瘠且水分波动明显; 木生铁皮石斛则附生于树干或树枝, 养分来源与水分保持条件相对稳定。不同生态条件下植物对资源的利用与代谢分配策略可能发生改变, 从而影响药效成分的积累^[6]。王景瑄等^[7]研究发现不同栽培基质下铁皮石斛内生真菌菌群结构和多样性存在差异, 石生铁皮石斛较木生铁皮石斛内生真菌多样性高多糖与甘露糖含量高, 揭示铁皮石斛内生真菌多样性越高, 越有利于其有效成分含量积累。

植物次生代谢产物的合成与积累受遗传背景与环境因素的共同调控^[8]。苯丙素类、类黄酮及生物碱等物质既是铁皮石斛重要的活性成分, 也是植物在逆境条件下发挥防御功能的关键代谢产物。近年来, 代谢组学与转录组学技术的发展为系统解析药材品质形成机制提供了新的手段。通过整合代谢物变化与基因表达差异, 可以从分子层面揭示栽培环境影响药效成分积累的内在机制。

本研究以石生与木生 2 种栽培基质条件下的铁皮石斛为研究对象, 采用非靶向代谢组学与转录组学整合分析策略, 系统比较不同基质下代谢物谱与基因表达模式的差异, 重点解析苯丙素类、类黄酮及生物碱等关键次生代谢通路的调控变化。传统观念往往将“石生”视为品质优越的象征, 而对“木生”评价偏低; 然而, 现代研究表明, 石斛属植物

本质上为典型附生植物,其附生基质(如树木、岩石等)会通过水分供给、养分来源与微生态环境等因素影响化学成分的积累,但基质差异并不必然导致药用品质的优劣之分,“木生”亦不等同于“不堪用”。基于此,本实验从分子层面梳理不同基质对代谢网络重构与功能基因表达的影响机制,阐明品质差异形成的生物学基础,为科学评价不同栽培基质下铁皮石斛的药用价值及其分级利用提供理论支撑。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究的 12 批铁皮石斛鲜条样品采集于浙江省乐清市雁荡山地区多家种植基地,涵盖石生与木生栽培基质。经浙江理工大学张晓丹副教授鉴定为兰科石斛属铁皮石斛 *D. officinale* Kimura & Migo。样品经切片处理后充分混匀,随机选取 10 片作为 1 个样本,每种栽培基质设置 3 次生物学重复。2 组样本经液氮速冻处理后,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行非靶向代谢组学及真核有参转录组测序分析。其中 C1 为木生铁皮石斛, C2 为石生铁皮石斛。

1.2 仪器

Q Exactive HF-X 型高分辨质谱仪(德国 Thermo Fisher Scientific 公司); Vanquish UHPLC 超高效液相色谱仪(德国 Thermo Fisher Scientific 公司); Hypersil Gold 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); D3024R 型低温离心机(美国 Scilogex 公司); Agilent 2100 型生物分析仪(美国 Agilent Technologies 公司); MGISEQ-T7 型基因测序仪(中国华大智造公司); Qubit 2.0 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 代谢组学分析

采用 Thermo Fisher 公司的 Vanquish Neo UHPLC 超高效液相色谱系统搭配 QExactive™HF-X 高分辨质谱仪进行代谢组学分析。色谱条件:色谱柱为 Hypersil Gold column C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm; Thermo Fisher, 美国);流动相为 0.1%甲酸(A)-甲醇(B),进样量为 3 μL,体积流量 0.2 mL/min,柱温为 40 ℃。质谱条件:样品经电喷雾电离,在正、负离子扫描模式下采集质谱信号。扫描范围 *m/z* 为 100~1 500,喷雾电压为 3.5 kV,鞘气压力为 35 psi,辅助气体积流量为 10 L/min,离子传输管温度为 320 ℃,S-lens RF 电平为 60,辅助气加热器温度为 350 ℃。MS/MS 采用数据依赖

性扫描模式^[9]。

取 100 mg 经液氮研磨处理的铁皮石斛组织样本,置于 EP 管中,加入 500 μL 80%甲醇水溶液,涡旋震荡后冰浴静置 5 min,于 4 ℃、15 000×*g* 离心 20 min。取适量上清液,加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%,再次于 4 ℃、15 000×*g* 离心 20 min,收集上清液,用于 LC-MS 分析。另外,从每个实验样本中取等体积样本混匀作为质控样本(quality control, QC),用于监测系统的稳定性^[10]。

使用 XCMS 软件对质谱数据进行预处理,结合 KEGG、HMDB、LIPIDMaps 及诺禾本地数据库进行代谢物鉴定与定性定量分析。采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)对样本(含质控样品)进行多元统计分析,用来区分各组间代谢轮廓的总体差异。基于单变量统计分析(*t* 检验)与多元统计分析,以 OPLS-DA 模型变量权重值(variable importance projection, VIP)≥1、差异倍数(fold chang, FC)>1.5 或<0.667 且 *P*<0.05 为阈值筛选差异代谢物(differential metabolite, DAM),并对其进行进一步分析。

2.2 转录组学分析

使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取铁皮石斛样品中的 RNA,每个处理设置 3 个生物学重复,随后通过 Agilent 2100 bioanalyzer 精确检测 RNA 完整性^[11]。委托北京诺禾致源科技股份有限公司基于 Illumina 平台建库测序并对原始数据去冗余过滤。

将得到的 clean reads 与铁皮石斛的参考基因组(ncbi_dendrobium_officinale_gca_019514585_1_officinale)对比。基于 FPKM 值评估基因表达水平,并使用 DESeq2 软件进行两组间的差异表达分析,以 FC≥2 且错误发现率(false discovery rate, FDR)≤0.01 为阈值筛选差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)。将差异表达基因注释到 GO、KEGG 数据库中,获得 DEG 的 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路富集分析结果^[12]。

2.3 联合分析

将差异代谢物(differentially accumulated metabolites, DAM)和 DEG 映射到 KEGG 通路数据库,以识别差异代谢物和差异表达基因以及共同显著富集的代谢通路。通过 KEGG 代谢通路图可以对差异代谢通路进行展示。

3 结果与分析

3.1 代谢组学分析

3.1.1 PCA 及聚类分析 如图 1-A 所示,基于非靶向代谢组学检测,经数据处理后,总共鉴定得到 2 878 个代谢物,其中正离子模式下鉴定数量为 1 583,负离子模式下鉴定数量为 1 295。图 1-B 显示 HMDB 化合物一级 (superclass) 分类中最高 5 类化合物分别为脂质和类脂分子 (28.77%)、苯丙素类和聚酮类 (16.57%)、有机酸及其衍生物 (14.63%)、有机杂环化合物 (12.30%)、苯类化合物 (10.88%)。对鉴定出的化合物进行聚类分析,图 1-C 发现木生铁皮石斛在脂质类、有机酸类、有机杂环、有机氧化类等初级代

谢产物较石生铁皮石斛富集,石生铁皮石斛在苯丙素类、苯类、生物碱类等次级代谢产物更富集。

对石生和木生铁皮石斛进行了代谢组分析,随后进行了 PCA 和 OPLS-DA,比较不同生长环境下铁皮石斛的代谢差异。如图所示,图 2-A 中 QC 样品聚集紧密,表明具有良好的重现性,2 个样本组分布在不同区域,第 1 主成分解释了其 73.35% 的特征,第 2 主成分解释了其 14.91% 的特征。

对石生和木生铁皮石斛进行 OPLS-DA 组间差异分析,图 2-B 显示, C1 和 C2 明显分离,第 1 主成分解释了其 85.3% 的特征,第 2 主成分解释了其 3.64% 的特征。OPLS-DA 模型的评估参数为 $R^2_X =$

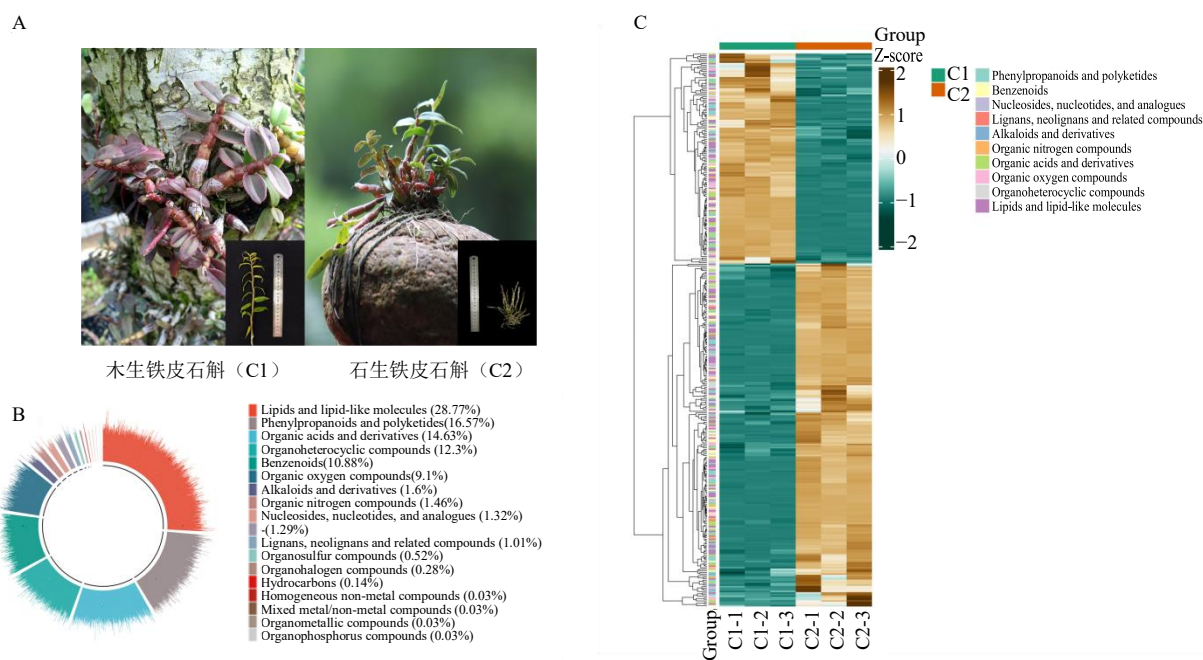


图 1 木生与石生铁皮石斛 (A)、总代谢物分类 (B)、总代谢物聚类分析 (C)

Fig. 1 Wood- and stone-cultivated *D. officinale* (A), overall metabolite classification (B), and overall metabolite cluster analysis (C)

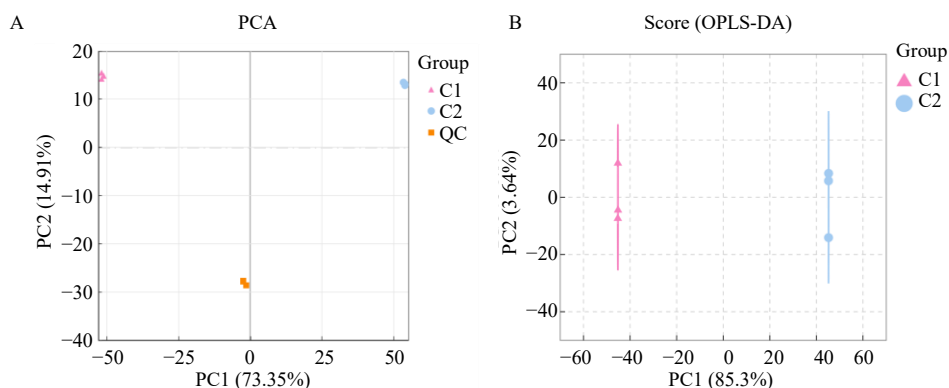


图 2 总样本 PCA 图 (A) 和 C1 与 C2 的 OPLS-DA 图 (B)

Fig. 2 Overall sample PCA plot (A) and OPLS-DA plot of C1 and C2 (B)

0.889, $R^2_Y=1$, $Q^2=0.998$, 均超过 0.5 的阈值, 这些数值确认了模型的可接受性和可靠性。

3.1.2 差异代谢物分析 基于 OPLS-DA 模型的结果, 根据阈值为 P 值 <0.05 , $VIP>1$, $FC>1.5$ 或 <0.667 作为差异代谢物筛选标准, 共鉴定出 354 个 DAMs, 占总测定代谢物的 12.3%, 其中木生铁皮石斛较石生铁皮石斛上调 135 个代谢物, 下调 219 个代谢物 (图 3-A)。这些 DAMs 主要包含 112 种脂质和类脂分子 (如脂肪酸及其衍生物、类固醇及其衍生物、萜类化合物等)、45 种有机酸及其衍生物 (主要为氨基酸类化合物)、42 种黄酮类、12 种生物碱类及碳水化合物等。并且次级代谢产物中黄酮类、生物碱类、氨基酸类生物活性成分在石生铁皮石斛中积累量显著更高。

与石生栽培铁皮石斛相比, 木生铁皮石斛中差异最显著的上调与下调代谢物各 10 种如图所示 (图 3-B)。上调代谢物主要为脂质和类脂分子, 如 pennogenin 3- O - β -chacotrioside 是含量上调最高的代谢物, 木生铁皮石斛是石生铁皮石斛的 8.87 倍, 下调代谢物主要为苯丙素类及聚酮类化合物 (以黄酮类为主), 如 isogemichalcone B 是下调最高的代

谢物。此外, homoeriodictyol、alfalone、(-)-glyceollin I 等黄酮类化合物在石生中显著富集。这些结果可能是说明 2 种栽培基质分别诱导不同类型的代谢适应策略。

对差异代谢物进行 KEGG 富集分析进一步了解与 DAM 相关的代谢途径。如图 3-C 所示, 基于 P 值, 识别出 20 条显著富集的代谢途径, 包括泛醌及其他萜类醌类生物合成、倍半萜类和三萜类生物合成、酪氨酸代谢、苯丙素类生物合成、各类生物碱生物合成、硫胺素代谢、类黄酮生物合成、氨基酸代谢、硫代葡萄糖苷生物合成等代谢途径。其中最显著的代谢途径是泛醌及其他萜类醌类生物合成代谢途径。

研究报道栽培基质对植物次生代谢产物的合成具有显著影响^[13]。本研究中, 石生铁皮石斛的黄酮类、生物碱类、氨基酸类及脂肪酸类物质 (如肉豆蔻酸、脂肪酸酯等) 显著积累。这与霍山石斛中石生栽培促进生物碱、总黄酮积累的研究结果一致^[14]。由此推测, 上述代谢物的积累是石生铁皮石斛适应特定生长环境的代谢响应。这些结果表明不同栽培基质下铁皮石斛中差异代谢物显著富

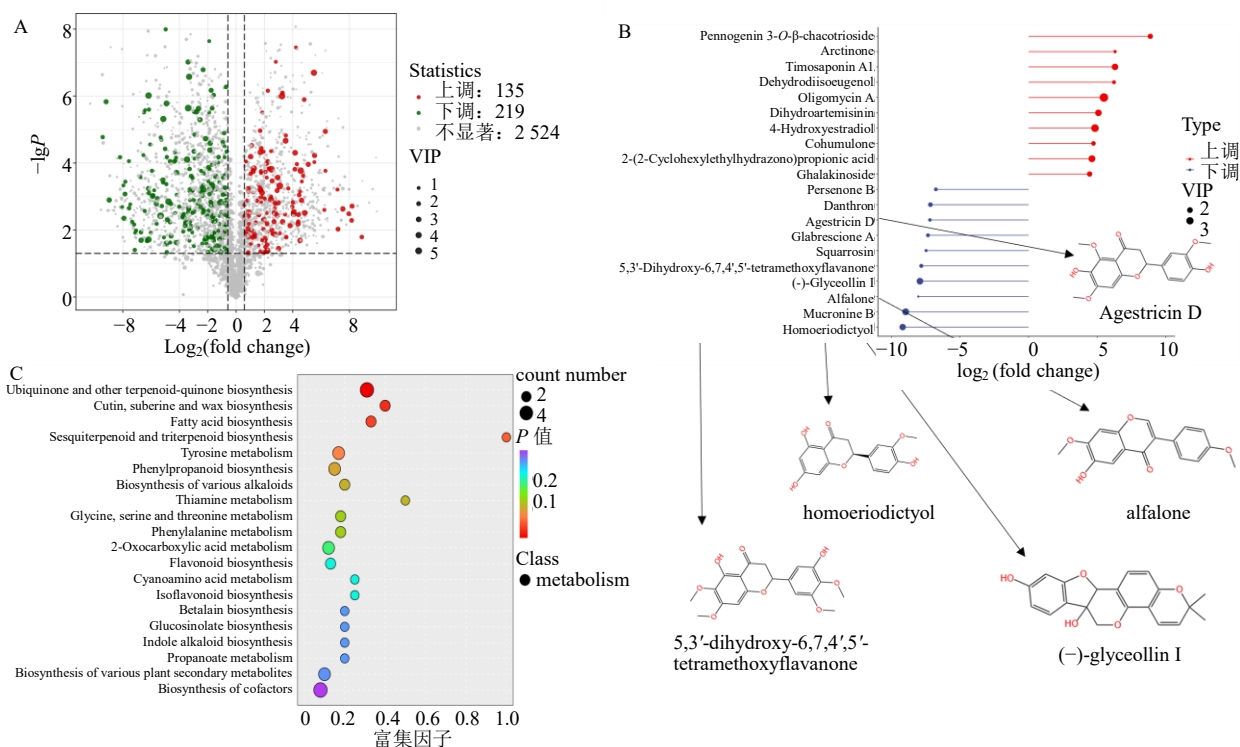


图 3 差异代谢物火山图 (A)、C1 较 C2 上下调的 20 种代谢物火柴杆图 (B) 和 KEGG 富集气泡图 (C)

Fig. 3 Volcano plot of differential metabolites (A), stick plot of 20 metabolites up- or down-regulated in C1 compared with C2 (B), and KEGG enrichment bubble plot (C)

集的代谢途径可能与其特性和药理作用密切相关。

3.2 转录组学分析

3.2.1 转录组学数据分析 转录组学分析共设计 6 个样本，包括石生铁皮石斛样本和木生铁皮石斛样本各 3 个。为了识别不同栽培基质下铁皮石斛中的 DEG，对石生铁皮石斛和木生铁皮石斛进行了 RNA 测序。共获得 289 473 040 条原始测序数据 (raw reads)，经过质控，得到 284 591 844 条条质控有效数据 (clean reads)。样本平均有效碱基数 (clean bases) 为 7.12 G，Q₂₀ 为 98.91%~99.35%，Q₃₀ 为 96.39%~97.57%，GC 含量为 44.77%~45.66%。采用 HISAT2 软件将 Clean

Reads 与参考基因组 (ncbi_dendrobium_officinale_gca_019514585_1_officinale) 进行比对，样本的测序数据与参考基因组的比对率为 79.03%~87.45% (表 1)。最终的比对统计结果显示，Q₃₀ 值高且样本重复性好，表明测序数据质量可靠。上述比对结果说明，该方法有效获取了足量的转录组信息，能够满足后续生物信息学分析的要求。本研究中以 FC≥2 且 FDR≤0.01 为标准，对石生铁皮石斛和木生铁皮石斛的 DEG 进行筛选。如图 4 所示，共鉴定筛选出 2 966 个 DEGs，石生铁皮石斛与木生铁皮石斛相比，1 582 个 DEGs 上调，1 384 个 DEGs 下调。

表 1 样本测序数据质量
Table 1 Sequencing data quality for samples

样品	原始序列数	原始碱基数/G	质控后序列数	质控后碱基数/G	测序错误率/%	Q ₂₀ /%	Q ₃₀ /%	GC/%	总序列数 (比对率/%)
C1-1	48 487 650	7.27	47 639 340	7.15	0.02	99.05	96.80	44.77	41 505 886 (87.13)
C1-2	47 366 040	7.10	46 463 224	6.97	0.02	99.05	96.77	44.80	40 557 783 (87.29)
C1-3	52 632 166	7.89	51 643 970	7.75	0.02	99.35	97.57	44.85	45 162 432 (87.45)
C2-1	47 704 006	7.16	47 023 244	7.05	0.02	98.91	96.39	45.59	38 063 330 (80.95)
C2-2	46 980 074	7.05	46 237 092	6.94	0.02	99.07	96.84	45.66	36 540 775 (79.03)
C2-3	46 303 104	6.95	45 584 974	6.84	0.02	99.25	97.24	45.42	36 542 443 (80.16)
总计	289 473 040	43.42	284 591 844	42.7					

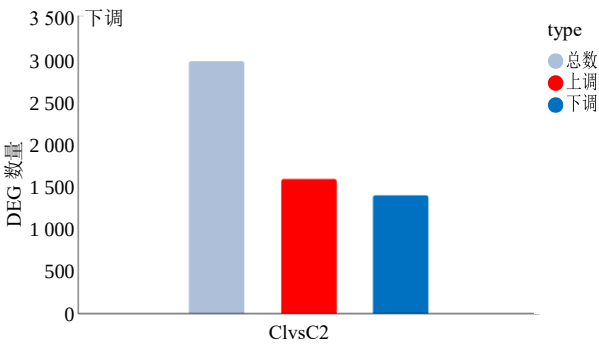


图 4 差异表达基因统计图
Fig. 4 Statistical chart of DEGs

3.2.2 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析 对石生和木生铁皮石斛的 DEG 进行 GO 功能富集分析。结果显示 2 966 个 DEGs 中有 1 272 个被注释到生物过程 (biological process, BP)，2001 个被注释到分子功能 (molecular function, MF)，385 个被注释到细胞组分 (cellular component, CC)。从图 5-A 可以看出，富集差异表达基因最多的 4 个功能类是分子功能的 oxidoreductase activity、acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen、ironion binding、heme binding、tetrapyrrole binding。

KEGG 通路富集分析显示有 596 个 DEGs 涉及细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing)、代谢 (metabolism)、遗传信息处理 (genetic information processing) 和人类疾病 (human diseases) 等 5 个大类 123 条通路。从 KEGG 富集分析结果图 5-B 可以得到，前 20 条显著富集的代谢通路主要涉及植物次生代谢过程，包括苯丙素类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、各类植物次生代谢物生物合成 (biosynthesis of various plant secondary metabolites)、类黄酮生物合成 (flavonoid biosynthesis)、二萜类生物合成 (diterpenoid biosynthesis) 以及托品烷、哌啶及吡啶生物碱生物合成 (tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis) 等。其中，苯丙素类生物合成通路富集最为显著，共包含 27 个 DEGs，其富集程度在所有显著富集通路中仅次于辅因子生物合成通路。结合已有研究，铁皮石斛中黄酮类、生物碱类等次级代谢产物的含量在不同栽培基质下存在显著差异。上述差异富集的代谢通路，如各类植物次生代谢物生物合成、类黄酮生物合成以及生物碱类生物合成等，调控这些次级代谢产物的生成。据此推测，这

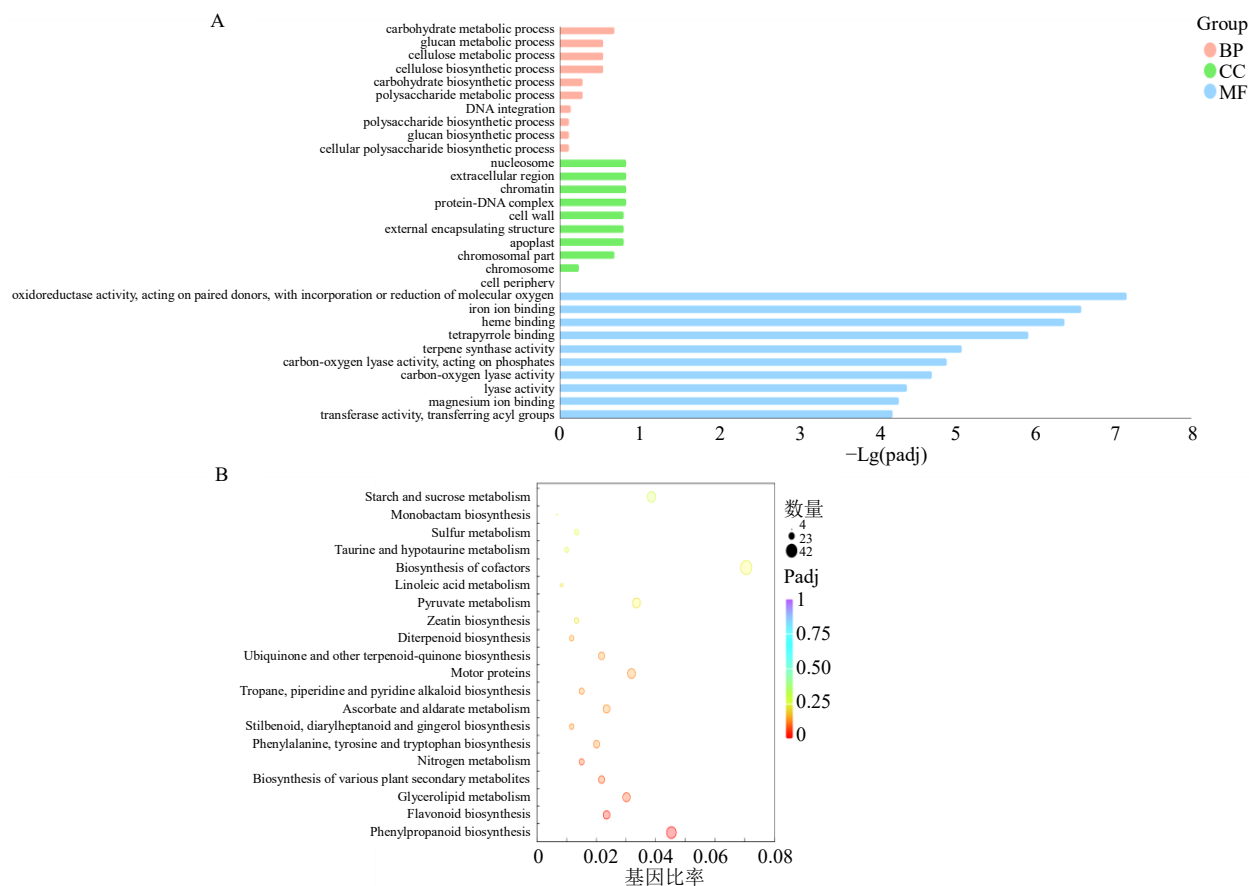


图 5 差异表达基因 GO 富集柱状图 (A) 和差异表达基因 KEGG 富集气泡图 (B)

Fig. 5 Bar plot of GO enrichment for DEGs (A), bubble plot of KEGG enrichment for DEGs (B)

些通路的表达变化可能是导致不同栽培基质下代谢物含量差异的重要原因。

3.3 代谢组与转录组联合分析

对石生与木生铁皮石斛的 DAM 及 DEG 进行通路富集比较。结果表明, DAM 富集于 9 条代谢通路, 差异表达基因富集于 92 条通路, 二者共同富集的通路共 31 条 (图 6-A)。共富集通路中代谢物与基因富集数量最多的前 10 条通路包括辅因子生物合成、氨基酸生物合成、苯丙素类生物合成、丙酮酸代谢、泛醌及其他萜类醌生物合成、各类植物次生代谢产物生物合成、类黄酮生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、2-氧代羧酸代谢、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成 (图 6-B)。进一步共富集分析显示 (图 6-C), 苯丙素类生物合成、类黄酮生物合成、各类植物次生代谢产物生物合成、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成、托品/哌啶/吡啶生物碱生物合成等途径在 2 组间均呈显著共富集。表明这些代谢途径在石生与木生栽培基质下铁皮石斛代谢响应过程中发挥了重要作用。

对木生铁皮石斛和石生铁皮石斛的共富集通路进行分析发现, 苯丙素类生物合成 (ko00940) 途径富集 27 个 DEGs 和 3 个 DAMs, 包括上调基因 *LOC110099301*、*LOC110103063* 和 *LOC110092517* 等 9 个, 下调基因 *LOC110102649*、*LOC110097166* 和 *LOC110113335* 等 18 个, 以及下调代谢物 sinapinic acid、*trans*-cinnamate 和上调代谢物 *L*-tyrosine; 类黄酮生物合成 (ko00941) 途径富集 14 个 DEGs 和 2 个 DAMs, 包括上调基因 *LOC110099164*、*LOC110092517* 和 *LOC110113968*, 下调基因 *LOC110106800*、*LOC110113109* 和 *LOC110107833* 等 11 个, 以及上调代谢物 galangin 和下调代谢物 homoeriodictyol; 苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸的生物合成 (ko00400) 途径富集 12 个 DEGs 和 1 个 DAM, 包括上调基因 *LOC110097990*、*LOC110110550* 和 *LOC110104411*, 下调基因 *LOC110109170*、*LOC110095047* 和 *LOC110093331* 等 9 个, 以及上调代谢物 *L*-tyrosine; 托品、哌啶和吡啶生物碱的生物合成 (ko00960) 途径富集 9 个

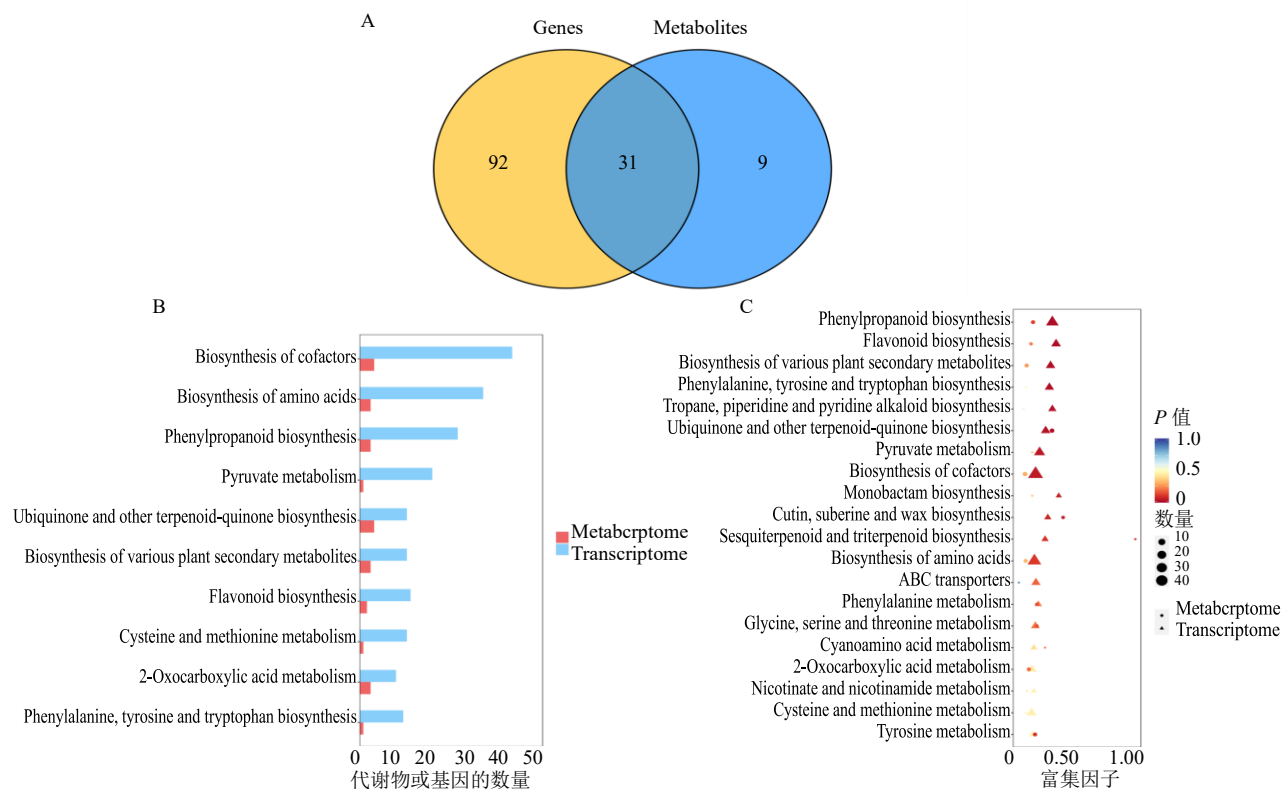


图 6 韦恩图 (A)、KEGG 共富集柱状图 (B)、KEGG 共富集气泡图 (C)

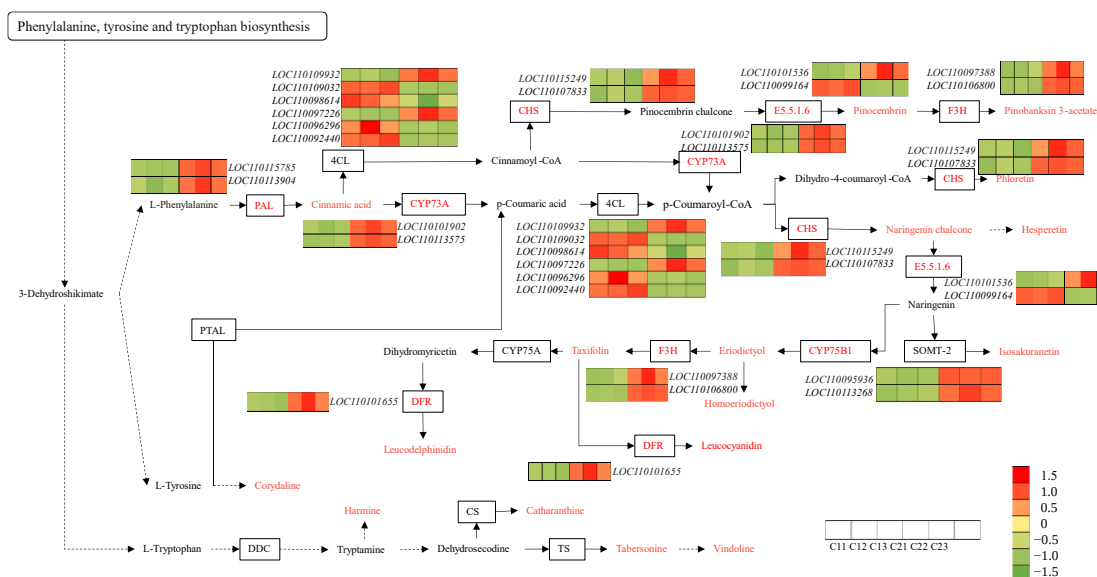
Fig. 6 Venn chart (A), KEGG co-enrichment bar plot (B), KEGG co-enrichment bubble chart (C)

DEGs 和 1 个 DAM, 包括上调基因 *LOC110104391* 和 *LOC110104391*, 下调基因 *LOC110097083*、*LOC110107833* 和 *LOC110114440* 等 7 个, 以及下调代谢物 *L*-pipecolic acid; 泛醌及其他萜类醌类生物合成 (ko00130) 途径富集 13 个 DEGs 和 4 个 DAMs, 包括上调基因 *LOC110109032*、*LOC110101193* 和 *LOC110113039* 等 6 个, 下调基因 *LOC110115102*、*LOC110101902* 和 *LOC110097226* 等 7 个, 以及上调代谢物 *L*-tyrosine 和下调代谢物 *trans*-cinnamate、vitamin K1 oxide、gamma-tocopherol; 辅因子生物合成 (ko01240) 途径富集 42 个 DEGs 和 4 个 DAMs, 包括上调基因 *LOC110097581*、*LOC110104263* 和 *LOC110103545* 等 20 个, 下调基因 *LOC110115102*、*LOC110105632* 和 *LOC110114164* 等 22 个, 以及上调代谢物 *L*-tyrosine、(R)-2-hydroxybutane-1,2,4-tricarboxylate 和下调代谢物 vitamin K1 oxide、gamma-tocopherol; 苯丙氨酸代谢 (ko00360) 途径富集 6 个 DEGs 和 2 个 DAMs, 包括下调基因 *LOC110097083*、*LOC110097323* 和 *LOC110114440* 等 6 个, 以及上调代谢物 *L*-tyrosine 和下调代谢物 *trans*-cinnamate。

KEGG 标记语言 (KGML) 记录了通路中各组

件的详细信息, 可基于此构建差异表达基因和差异代谢物与相应通路之间的关联网络。由于一条通路通常涉及多个基因和代谢物, 而一个基因或代谢物也可能同时参与多条通路, 因此该网络能够直观反映分子与通路间的多对多关系^[15]。基于共富集分析结果, 类黄酮生物合成途径与苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸的生物合成途径与苯丙素类生物合成途径存在关联, 这些通路共享部分中间代谢产物, 其合成与积累与铁皮石斛的药效作用密切相关。

为此, 本研究进一步联合代谢组与转录组分析构建了苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成途径、苯丙素类生物合成途径、类黄酮生物合成途径及生物碱合成途径的整合调控网络 (图 7)。结果显示, 在石生铁皮石斛样品中, 苯丙素-类黄酮代谢关键酶苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 及关黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 基因整体呈上调表达趋势。PAL 基因上调促进 *L*-phenylalanine 向 cinnamic acid 的转化, 增强苯丙素通路碳流输入; CHS 基因表达上调推动 P coumaroyl coa 向 naringenin chalcone 等中间产物转化; F3H 基因表达上调进一步



红色表示石牛栽培基质铁皮石斛代谢物上调和基因上调, 绿色表示基因下调。

Red indicates upregulated metabolites and upregulated genes in *D. officinale* grown on stone-based cultivation substrate, and green indicates downregulated genes.

图 7 代谢途径图

Fig. 7 Metabolic pathway diagram

促进二氢黄酮醇类物质生成。与基因表达变化相一致, 下游相关代谢物如 pinocembrin、naringenin、taxifolin、eriodictyol 及 leucocyanidin 等在石生样品中整体呈上调趋势, 显示出明显的通路协同增强效应。同时, 芳香族氨基酸分支及部分生物碱合成相关代谢物亦表现出同步上调特征, 提示碳氮代谢资源向防御型次生代谢途径倾斜。联合分析表明石生栽培基质通过上调 PAL、CHS、F3H 等关键酶基因表达, 增强苯丙素—类黄酮通路代谢通量, 并带动相关黄酮及部分生物碱类代谢物积累, 形成以次生代谢增强为特征的代谢表型。

4 讨论

4.1 不同栽培基质下铁皮石斛的代谢差异及其调控途径分析

关于不同栽培基质对雁荡山铁皮石斛品质影响的研究,以往多集中于农艺性状和主要活性成分含量等指标的比较,对次生代谢产物积累及其分子调控机制的探讨相对有限,且不同栽培基质下铁皮石斛中的多糖、总黄酮、生物碱、酚酸等成分含量差异显著^[16]。本研究发现,石生与木生 2 种栽培基质下,铁皮石斛的代谢谱和转录表达特征存在明显差异。通过代谢组学共鉴定出 354 个差异代谢物,占全部检测代谢物的 12.3%,表明栽培基质对次生代谢过程具有广泛调控作用。

石生与木生栽培基质下,铁皮石斛的次生代谢

产物积累呈现明显差异。相较于木生栽培基质，石生样品中黄酮类、生物碱类及氨基酸类代谢物整体积累水平更高，其中 isogemichalcone B、homoeriodictyol 等黄酮类化合物，以及 tabersonine、rauwolscine 等生物碱类化合物在石生铁皮石斛中显著富集。黄酮类代谢物在差异代谢物中占比最高，种类丰富且活性较强，是铁皮石斛常见的药理活性成分和质量控制指标^[17]。研究表明，黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、调血脂及神经保护等多重生物活性，其在逆境条件下的合成与积累有助于植物应对生物与非生物胁迫，维持正常生长^[18]。本研究中石生样品黄酮类物质水平较高，提示该栽培方式可能通过诱导次生代谢产物积累，进而提升药材的药用价值。叶梅荣等^[19]在对石斛的研究中也发现，石生栽培可显著促进生物碱和总黄酮的积累，与本结果相互印证。相比之下，木生栽培基质下次生代谢产物有一定积累，但和石生相比，脂质和类固醇类物质相对富集。代谢组与转录组联合分析显示，上述代谢差异主要与苯丙素类生物合成、类黄酮生物合成、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成以及托品烷/哌啶/吡啶生物碱生物合成等通路的协同调控有关。以上结果表明，类黄酮化合物的差异积累是不同栽培基质导致铁皮石斛品质变化的关键因素之一。进一步分析发现，类黄酮生物合成途径中的 F3H 的基因表达水平在石生铁皮石斛中显著上调，该酶

催化类黄酮合成下游产物的生成,与总黄酮含量的升高趋势一致。说明石生栽培基质可能通过调控 *F3H* 等关键酶基因的表达,增强类黄酮合成通路的代谢流,进而促进相关活性成分的积累。

4.2 苯丙素类与类黄酮生物合成通路的调控分析

本研究显示,苯丙素类生物合成与类黄酮生物合成通路在石生与木生栽培基质下呈现显著的协同富集特征。其中,苯丙素类通路共检测到 27 个 DEGs 及 3 个 DAMs,类黄酮通路则检测到 14 个 DEGs 及 2 个 DAMs,表明 2 条通路在转录和代谢层面均受到栽培基质的调控。苯丙素通路作为芳香族氨基酸向多种次生代谢产物转化的枢纽,其关键酶包括 *PAL*、*C4H* 及 *4CL*。类黄酮分支则涉及 *CHS*、*F3H* 等关键酶^[20]。

值得注意的是,尽管 *L*-tyrosine 在木生样品中含量较高,但黄酮类物质却在石生样品中显著积累,提示石生栽培基质下苯丙素-类黄酮通路具有更高的代谢通量。这可能是由于石生栽培基质养分含量较低、水分保持能力较弱,植株长期处于轻度胁迫状态,在逆境信号(如活性氧积累、光照波动或水分胁迫)刺激下,苯丙素-类黄酮代谢通路常被诱导激活,即使前体氨基酸水平未显著升高,只要 *PAL*、*CHS* 等关键酶表达增强,碳代谢被优先导入苯丙素-类黄酮分支,实现类黄酮终产物的高效积累^[21-22]。本研究中,苯丙素类通路富集的 27 个 DEGs 与类黄酮通路富集的 14 个 DEGs 中,多个关键酶 *PAL*、*CHS*、*F3H* 基因在石生样品中呈上调表达,进一步支持这一推测。类黄酮作为铁皮石斛抗氧化与抗炎活性的主要物质基础,其合成增强是植株应对氧化胁迫的重要响应策略。由此推测,石生栽培基质可能通过改变根系微环境,诱导一定程度的氧化压力,促使苯丙素-类黄酮代谢途径活跃表达,从而提高黄酮类成分积累水平,增强植株整体抗氧化能力。这一调控模式反映了环境因子驱动的代谢重编程机制,是不同栽培基质下铁皮石斛品质差异形成的重要生理基础。

4.3 芳香族氨基酸代谢和生物碱类生物合成通路的调控分析

苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成通路与生物碱生物合成通路在联合分析中显著共富集,表明氮代谢与含氮次生代谢之间存在紧密联系。*L*-tyrosine 在木生样品中升高相对应,石生样品中生物碱类物质含量更高,这一现象进一步表明,次生代谢终产

物的积累并不完全依赖前体物质的绝对大小,而更取决于代谢通量是否被有效流入特定代谢分支。在木生栽培环境中,养分供应相对充足,植物可能优先满足生长相关需求,使芳香族氨基酸更多用于蛋白质合成与组织建成,表现为前体积累但分支利用效率相对有限。在石生环境中,资源限制和生态胁迫可能诱导植物将碳氮资源优先分配至防御相关代谢途径^[23]。生物碱作为典型的防御型次生代谢产物,在抗病原微生物和抗食草动物方面发挥重要作用^[24]。这种差异本质上反映了碳氮资源在“生长-防御”之间的权衡分配机制。石生栽培通过诱导分支代谢通量重定向,提高功能性次生代谢产物含量,而木生栽培基质则表现为较强的初级代谢潜力。

4.4 不同栽培基质驱动代谢分化及其应用定位

针针对前人“木斛不堪用,用之无功”的传统论断缺乏科学依据,本研究借助代谢组与转录组联合分析,明晰了铁皮石斛在石生、木生栽培基质下代谢网络的系统性分化特征,以现代科学视角修正了这一传统认知。石生栽培基质下,苯丙素、类黄酮及生物碱合成通路显著增强,黄酮类、生物碱类及部分氨基酸类活性成分明显富集,呈现出防御型次生代谢通量提升的特征,这些成分具有明确的抗氧化、抗炎、免疫调节及神经保护等药理活性,具备较高的药用开发价值^[25]。相比之下,木生栽培基质下芳香族氨基酸供给增强,脂质及类固醇类物质相对富集,呈现出初级代谢活跃和结构功能型成分积累的特征。尽管其在传统评价体系中黄酮与生物碱含量相对较低,但脂质和植物甾醇类物质在代谢调节、心血管健康及皮肤屏障修护等方面具有潜在功能价值,使其在功能性食品、营养补充剂及化妆品领域具备开发潜力^[26]。

由此可见,石斛与木斛的差异并非简单的品质优劣,而是代谢资源配置策略不同所形成的功能分化。石生栽培基质更适合向高活性、高精度的药用产品方向延伸,而木生栽培基质则可在规模化功能食品及日化应用领域实现价值拓展,二者共同为铁皮石斛资源的分级利用与功能定位提供了理论依据。

本研究基于非靶向代谢组学与转录组学的整合分析,系统揭示了石生与木生栽培基质驱动铁皮石斛代谢网络系统性重编程的特征及其分子调控基础。共鉴定到 2 878 个代谢物,其中 354 个在不

同栽培基质下显著差异积累, 主要涉及苯丙素类、类黄酮、生物碱、脂质及芳香族氨基酸等物质。代谢通路分析显示, 苯丙素类生物合成 (ko00940)、类黄酮生物合成 (ko00941)、苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成 (ko00400) 以及托品/哌啶/吡啶生物碱生物合成 (ko00960) 等途径在 2 种栽培基质间显著分化。石生样品中黄酮类与生物碱类代谢物显著富集, 而木生样品中芳香族氨基酸及脂质类物质相对积累, 反映出不同栽培环境下碳氮资源分配策略的差异。转录组分析共筛选出 2 966 个差异表达基因, 多个次生代谢通路显著富集, 其中类黄酮合成途径关键酶基因 (如 PAL、CHS、F3H) 在石生样品中上调表达, 与代谢物积累趋势一致, 表明代谢差异主要源于通路关键节点的转录调控增强。联合分析进一步支持: 栽培基质通过调控苯丙素-类黄酮-生物碱代谢相关基因表达, 改变代谢分配方向, 进而形成差异化代谢表型。综合代谢与转录特征, 本研究提出一种栽培基质驱动的“生长-防御权衡”代谢分化模型: 石生栽培基质在相对受限的生境中促进防御型次生代谢通量提升, 木生栽培基质则更利于初级代谢与结构功能型物质合成, 二者并非品质优劣之分, 而是代谢资源配置策略的功能分化体现。

研究结果表明, 不同栽培基质通过调控次生代谢相关基因表达与代谢通路活性, 影响苯丙素类、类黄酮及生物碱等药效成分的积累, 从分子层面揭示了生境差异与品质形成之间的内在联系。石斛属植物本为典型附生植物, 其附生基质 (如树木或岩石) 通过水分、养分供给及微生态环境等因素参与调控化学成分的形成, 因此基质差异确会带来代谢谱的变化, 但并不构成简单的优劣划分, “木生”亦不等同于“不堪用”。本研究在明确不同基质对基因与代谢表达机制影响的基础上, 为铁皮石斛栽培基质的合理选择与药材分级利用提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen W H, Lu J M, Zhang J H, *et al.* Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and quality control of *Dendrobium officinale* Kimura et. Migo [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 726528.
- [2] Song C, Ma J B, Li G H, *et al.* Natural composition and biosynthetic pathways of alkaloids in medicinal *Dendrobium* species [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 850949.
- [3] Xu X Y, Zhang C, Wang N, *et al.* Bioactivities and mechanism of actions of *Dendrobium officinale*: A comprehensive review [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022(1): 6293355.
- [4] 黄璐琦, 张瑞贤. 道地药材理论与文献研究 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 56.
- [5] 李时珍. 本草纲目 [M]. 长春: 吉林大学出版社, 2009.
- [6] Gao L L, Wang F, Hou T T, *et al.* *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 920823.
- [7] 王景瑄, 陈文华, 李思琦, 等. 不同栽培模式铁皮石斛可培养内生真菌菌群结构、多样性及分布规律 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2917-2924.
- [8] 段乐鹏, 谢丽琼, 马艺沔, 等. 转录因子对药用植物次生代谢的调控作用 [J]. *中药材*, 2021, 44(4): 1002-1007.
- [9] Barri T, Dragsted L O. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 768: 118-128.
- [10] Yuan M, Breitkopf S B, Yang X M, *et al.* A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(5): 872-881.
- [11] 杨乐, 聂聪, 龙小琴, 等. 铁皮石斛 SPL 膜结合 (STM) 转录因子的全基因组鉴定及表达分析 [J]. *广西植物*, 2023, 43(6): 1041-1050.
- [12] 许张婷, 郑飞雄, 邓孝汲, 等. 代谢组和转录组联合分析绿光对铁皮石斛黄酮代谢的影响 [J]. *核农学报*, 2026, 40(1): 25-35.
- [13] Jahan T, Huda M N, Zhang K X, *et al.* Plant secondary metabolites against biotic stresses for sustainable crop protection [J]. *Biotechnol Adv*, 2025, 79: 108520.
- [14] 易善勇, 康传志, 王威, 等. 霍山石斛种植模式比较及拟境栽培的优势分析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(8): 1864-1868.
- [15] Ren X X, Huang Y Q, Zhang L, *et al.* Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics of *Dendrobium officinale* flowers at different developmental stages [J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 10342.
- [16] Luo Z F, Liu L, Nie Q, *et al.* HPLC-based metabolomics of *Dendrobium officinale* revealing its antioxidant ability [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1060242.
- [17] Xu L, Cao M T, Wang Q C, *et al.* Insights into the plateau adaptation of *Salvia castanea* by comparative genomic and WGCNA analyses [J]. *J Adv Res*, 2022, 42: 221-235.
- [18] Liga S, Paul C, Péter F. Flavonoids: Overview of

- biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques [J]. *Plants*, 2023, 12(14): 2732.
- [19] 叶梅荣, 王晓鹏, 赵干, 等. 基于非靶向代谢组技术解析 3 种栽培模式下霍山石斛代谢成分的差异 [J]. *西北农业学报*, 2025(9): 1704-1713.
- [20] Rutkowska M, Balcerczak E, Świechowski R, *et al.* Seasonal variation in phenylpropanoid biosynthesis and *in vitro* antioxidant activity of *Sorbus domestica* leaves: Harvesting time optimisation for medicinal application [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 156: 112858.
- [21] Bao H, Bao H N, Wang Y, *et al.* Challenges and strategies in the industrial application of *Dendrobium officinale* [J]. *Plants*, 2024, 13(21): 2961.
- [22] Sharma A, Shahzad B, Rehman A, *et al.* Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2452.
- [23] Pradhan J, Pramanik K, Jaiswal A, *et al.* Biosynthesis of secondary metabolites in aromatic and medicinal plants in response to abiotic stresses: A review [J]. *J Exp Bio & Ag Sci*, 2024, 12(3): 318-334.
- [24] Wang J H, Zheng Q Y, Wang C X, *et al.* Classification of soybeans from different habitats based on metabolomic-transcriptomic integration [J]. *Appl Biol Chem*, 2024, 67(1): 30.
- [25] Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, *et al.* Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 182.
- [26] Olasehinde T A, Olaniran A O, Okoh A I. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 480.

[责任编辑 时圣明]