基于沙氏鹿茸草组培体系的不同光周期培养黄酮类成分差异积累多组学分析

熊　敏，却志群，卢其能，陈　刚，周国华，巢新睿，沈春修*

宜春学院 江西省教育厅赣西特色作物种质创新与绿色高值利用重点实验室，江西 宜春　336000

摘　要：目的　对沙氏鹿茸草 *Monochasma savatieri* 的组培生根体系进行优化，获得稳定生长的组培苗，基于该组培苗探究沙氏鹿茸草在不同光周期培养条件下黄酮类成分的差异积累特征，并解析其黄酮类物质积累的分子调控机制。**方法**　采用单因素实验优化基本培养基及生长素浓度，筛选出适宜组培苗生根的培养基配方；以优化体系获得的组培苗为材料，设置短日照（SD）、中日照（DN）和长日照（LD）3 种光周期处理，培养 30 d 后，利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS）与高通量转录组测序（RNA-seq）进行非靶向代谢组学与无参转录组学联合分析，筛选与黄酮相关的差异积累代谢物及其候选代谢酶基因。**结果**　生根体系优化结果显示，最佳基本培养基为木本植物培养基（woody plant medium，WPM），最佳激素处理质量浓度为 1.0 mg/L 萘乙酸（1-naphthylacetic acid，NAA）。非靶向代谢组分析共获得 42 个黄酮相关差异积累代谢物，包括芦丁、槲皮素-3-β-*D*-葡萄糖苷、3-*O*-甲基槲皮素、矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷、7,4′-二羟基黄酮等，其中，SD 处理下差异黄酮类成分的总体相对含量最高。无参转录组分析共筛选到 21 个黄酮生物合成相关差异表达基因，主要涉及肉桂酸-4-羟化酶（cinnamate 4-hydroxylase，C4H）、花青素 3-*O*-葡糖基转移酶（anthocyanin 3-*O*-glucosyltransferase，BZ1）、黄酮 3′-单加氧酶（flavone 3′-monooxygenase，F3′H）、4-香豆酸辅酶 A 连接酶（4-coumaric acid coenzyme A ligase，4CL）、查耳酮合酶（chalcone synthase，CHS）、黄酮合成酶 II（flavonoid synthase II，FNS II）、苯丙氨酸解氨酶（phenylalanine ammonia lyase，PAL）和查耳酮异构酶（chalcone isomerase，CHI）等黄酮生物合成途径关键结构基因；其中，SD 与 DN 处理间黄酮类差异基因数量变化最明显，SD 与 LD 处理间次之，DN 与 LD 处理间差异最小。联合转录组与代谢组分析显示，在黄酮生物合成相关通路中共映射到 13 个黄酮相关差异积累代谢物和 12 个差异表达基因；相关性分析表明，7,4′-二羟基黄酮与 *C4H*、*BZ1*、*4CL* 和 *PAL* 等基因呈显著正相关，而芦丁、异槲皮苷、槲皮苷和矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷等与部分关键结构基因呈显著负相关。此外，预测出 *bHLH*、*WRKY*、*MYB_related* 等 14 个转录因子家族可能参与沙氏鹿茸草光周期响应的转录调控。**结论**　光周期是调控沙氏鹿茸草黄酮类成分积累的重要环境因素，其中短日照条件最适合黄酮类物质的积累。联合代谢组与转录组分析表明，多种黄酮差异代谢物与 *C4H*、*4CL*、*PAL*、*CHS* 等黄酮生物合成关键结构基因的表达显著相关，并可能受 *bHLH*、*WRKY*、*MYB_related* 等转录因子协同调控。初步揭示了光周期调控沙氏鹿茸草黄酮类成分差异积累的分子机制，为进一步解析关键酶基因及相关转录因子的功能提供理论基础，并为植物工厂条件下通过定向调控光周期促进黄酮类活性成分积累提供参考。

关键词：沙氏鹿茸草；组培生根体系；光周期；非靶向代谢组；无参转录组；黄酮生物合成途径

中图分类号：R282.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)22 - 9111 - 15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.22.024

Multi-omics analysis of differential flavonoid accumulation under different photoperiods in *Monochasma savatieri* tissue culture system

XIONG Ming, QUE Zhiqun, LU Qineng, CHEN Gang, ZHOU Guohua, CHAO Xinrui, SHEN Chunxiu

Key Laboratory of Germplasm Innovation and Green High-Value Utilization of Characteristic Crops in Western Jiangxi, Jiangxi Provincial Department of Education, Yichun University, Yichun 336000, China

Abstract: Objective　To optimize the tissue culture rooting system of *Monochasma savatieri* and obtain stably growing plantlets, and, based on these plantlets, to investigate the differential accumulation characteristics of flavonoid components in *M. savatieri* under different photoperiod culture conditions and elucidate the molecular regulatory mechanism of flavonoid accumulation. **Methods**　A single-factor experiment was conducted to optimize the basal medium and auxin concentrations, and select medium formula suitable

收稿日期：2026-06-05

基金项目：国家自然科学基金项目（32160484）；国家自然科学基金项目（31660379）；江西省自然科学基金面上项目（20212BAB205025）

作者简介：熊　敏，硕士研究生，主要从事药用植物栽培与生理研究。E-mail: x2065004@163.com

***通信作者：**沈春修，教授，博士，主要从事药用植物栽培与生理研究。E-mail: shenchunxiu@126.com

for the rooting of tissue culture seedlings. The seedlings obtained from the optimized system were subjected to three photoperiod treatments—short day (SD), day-neutral (DN), and long day (LD)—and cultured for 30 days. Subsequently, combined analysis of non-targeted metabolomics and de novo transcriptomics was conducted using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and high-throughput transcriptome sequencing (RNA-seq) to identify differentially accumulated metabolites and their candidate metabolic enzyme genes associated with flavonoids. **Results** The rooting optimization results showed that woody plant medium (WPM) was the optimal basal medium and 1.0 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA) was the optimal plant growth regulator concentration. Untargeted metabolomic analysis identified 42 differentially accumulated flavonoid-related metabolites, including rutin, quercetin-3-*O*-glucoside, 3-*O*-methylquercetin, cyanidin-3-*O*-rutinoside, and 7,4′-dihydroxyflavone; among them, the overall relative content of differential flavonoid components was the highest under SD treatment. De novo transcriptomic analysis screened 21 differentially expressed genes related to flavonoid biosynthesis, mainly involving key structural genes in the flavonoid biosynthetic pathway, such as cinnamate 4-hydroxylase (*C4H*), anthocyanin 3-*O*-glucosyltransferase (*BZ1*), flavone 3′-monooxygenase (*F3′H*), 4-coumaric acid coenzyme A ligase (*4CL*), chalcone synthase (*CHS*), flavonoid synthase II (*FNS II*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), chalcone isomerase (*CHI*). The variation in the number of flavonoid differential genes was the most pronounced between SD and DN treatments, followed by that between SD and LD, whereas the difference between DN and LD was the smallest. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses showed that 13 differentially accumulated flavonoid-related metabolites and 12 differentially expressed genes were mapped to flavonoid biosynthesis-related pathways. Correlation analysis indicated that 7,4′-dihydroxyflavone was significantly positively correlated with genes such as *C4H*, *BZ1*, *4CL*, and *PAL*, whereas rutin, isoquercitrin, quercitrin, and cyanidin-3-*O*-rutinoside were significantly negatively correlated with some key structural genes. In addition, 14 transcription factor families, including *bHLH*, *WRKY*, and *MYB_related*, were predicted to be involved in the transcriptional regulation of photoperiod responses in *M. savatieri*. **Conclusion** Photoperiod is an important environmental factor regulating the accumulation of flavonoids in *M. savatieri*, with SD conditions being the most favorable for flavonoid accumulation. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses revealed that several differentially accumulated flavonoid metabolites were significantly correlated with the expression of key structural genes involved in flavonoid biosynthesis, including *C4H*, *4CL*, *PAL*, and *CHS*, and may be co-regulated by transcription factors such as *bHLH*, *WRKY*, and *MYB_related*. This study preliminarily reveals the molecular mechanisms underlying photoperiod-regulated differential accumulation of flavonoids in *M. savatieri*, providing a theoretical foundation for further elucidating the functions of key enzyme genes and related transcription factors, and offering a reference for enhancing flavonoid accumulation through targeted photoperiod regulation under plant factory cultivation conditions.

Key words: *Monochasma savatieri* Franch. ex Maxim.; tissue culture rooting system; photoperiod; untargeted metabolomics; de novo transcriptome; flavonoid biosynthesis pathway

沙氏鹿茸草 *Monochasma savatieri* Franch. ex Maxim.隶属于玄参科鹿茸草属，为多年生半寄生药用植物，全草可入药，具有清热解毒、祛风止痛和凉血止血等功效[1]。在炎宁片、炎宁颗粒和炎宁冲剂等中成药中，沙氏鹿茸草为主要原料之一。其中，黄酮类次生代谢产物是其代表性活性成分，相关研究表明其具有抗氧化、抗菌、抗炎及抗肿瘤等药理活性[2]。

随着沙氏鹿茸草药用价值的进一步开发，市场需求呈增加趋势。然而，野外采挖和生境干扰等因素叠加其自然繁殖能力相对有限，导致野生资源下降并加剧供需矛盾。因此，建立稳定的人工繁育与生产体系具有现实意义。植物组织培养可在可控条件下实现快速扩繁，是提升供给的重要途径之一。在人工培养条件下，药用植物活性成分的积累除受遗传背景影响外，还会受到培养环境条件的显著调节[3]。在多种环境因子中，光照与温度对组培苗的生长发育及代谢物形成具有关键影响；相较于光照强度和光质在生产中相对易于固定，光周期（光照与黑暗的周期性交替）更需要结合物种特性与目标代谢物积累进行参数探索与优化。

光周期不仅影响植物光合作用与呼吸作用等基础代谢过程，还可通过影响植物激素合成与平衡等途径间接作用于次生代谢，从而为调控代谢物积累提供可能。已有研究在多种作物与模式植物中观察到光周期可显著改变代谢物组成及含量：Liu 等[4]比较卷心菜和中国芥菜在不同光周期培养 8 d 后的代谢差异，发现长日照处理可提高包括类黄酮在内的多种代谢物含量；张渊博等[5]以生菜为材料发现，16 h 光照/8 h 黑暗更有利于地上部类黄酮、维生素 C 和总酚含量增加，而 20 h 光照/4 h 黑暗更有利于根系生长及部分初级代谢物积累。Yu 等[6]在植物工厂条件

下研究表明，光周期能够影响水稻籽粒营养代谢物的积累，短日照相较于 12 h/12 h 处理可提高籽粒中黄酮类、氨基酸与维生素等多类代谢物含量。类似地，小豆叶片在短日照诱导条件下，黄酮类与酸类代谢物也表现为主要差异积累成分[7]。综上，光周期是驱动植物代谢物积累差异的重要环境因子，但不同物种对光周期的响应方向与幅度存在差异，尤其黄酮类代谢呈现一定物种特异性，因此有必要在目标药用植物中开展系统研究以获得更具针对性的调控线索。

在植物组织培养过程中，生长良好的根系有利于组培苗高效吸收水分和矿质元素，为代谢物的合成提供充足的原料。此外，良好生长的根系有利于植物激素的正常合成，调节植物生长发育过程，刺激植物代谢合成相关基因的表达，进而影响代谢物的积累。本研究先进行沙氏鹿茸草组培苗生根体系优化，根据筛选出的适宜沙氏鹿茸草组培苗生根的最优培养基配方，在以此培养基上培养生长的沙氏鹿茸草组培苗为材料，采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术（UHPLC-QTOF-MS）与 RNA-Seq 转录组联合分析，比较短日照（SD）、中日照（DN）和长日照（LD）处理条件下的黄酮类代谢差异物，挖掘与黄酮生物合成密切相关的关键酶基因，揭示 3 个光周期处理对沙氏鹿茸草黄酮类活性成分代谢网络的调控模式。通过非靶向代谢组与无参转录组联合分析，筛选与黄酮生物合成相关的候选代谢物、关键酶基因与候选转录因子。研究结果可为沙氏鹿茸草人工培养过程中光周期参数优化及质量指标建立提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

以沙氏鹿茸草组培苗为材料，采自江西省宜春市袁州区彬江镇霞塘村鹿茸草种植基地，由宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室主任邹一平教授鉴定为沙氏鹿茸草 *M. savatieri* Franch. ex Maxim.。培养条件的光照强度维持在 60 μmol/(m^2·s)，12 h 光照/12 h 黑暗，温度 28 ℃。培养基碳源由白糖（30 g/L）提供，pH 值为 5.8，活性炭 0.5 g/L。实验使用 LED 灯作为光源，植株在光照培养箱中进行培养。

1.2 仪器

UPLC Acquity I-Class PLUS 超高效液相色谱仪（沃特世科技有限公司）；ABI Stepone Plus 荧光定量 PCR 仪[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；SW-CI-1FD 超净工作台（苏州智净净化设备有限公司）；PAK410108 型 LED 灯（广东三雄极光照明股份有限公司）；LRH-800-G 型光照培养箱（广东泰宏君科学仪器股份有限公司）。

2 方法

2.1 组培苗生根体系优化

采用单因素实验设计，选取生长状态一致、高度为 4～5 cm 的无菌组培苗为实验材料，分别采用 WPM 培养基（批号 HBZ0609，250 g）、MS 培养基（批号 HB8469-5，250 g）、1/2MS 培养基（批号 HB8469-6，250 g）、B5 培养基（批号 MMPYJ034，500 g）和 N6 培养基（批号 HBZ0601，250 g），探究不同培养基对沙氏鹿茸草生根率的影响。其中，WPM、MS、1/2MS 和 N6 培养基来自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司，B5 培养基来自杭州木木生物科技有限公司。根据基本培养基筛选结果，将沙氏鹿茸草组培苗剪切成 2～3 cm 的茎段，平铺于最佳培养基上，分别添加不同质量浓度的 NAA（0.1、0.5、1.0 mg/L）和 IBA（0.1、0.5、1.0 mg/L），探讨 2 种生长素及其不同质量浓度对沙氏鹿茸草生根率的影响。

2.2 光周期处理

对生长状态一致的组培苗设置 3 种光周期处理：短日照（SD，8 h 光照/16 h 黑暗）、中日照（DN，12 h 光照/12 h 黑暗）和长日照（LD，16 h 光照/8 h 黑暗），其余培养条件与“1.1”项保持一致。培养 30 d 后，立即从培养箱中取出，收集茎叶样品，分装于 50 mL 离心管（3.0～3.5 g/管），每个处理设 3 个生物学重复；样品经液氮速冻后干冰运输至武汉万摩科技有限公司，并委托该公司完成转录组测序与代谢组检测。

2.3 代谢组分析

2.3.1 不同光周期处理条件下的非靶向代谢组检测 样品前处理参照胡悦等[8]的方法，采用 Waters ACQUITY UPLC I-Class PLUS 超高效液相色谱系统与 Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱联用平台进行样品检测。液相色谱条件主要包括：Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相 A 为 0.1%的甲酸水溶液，流动相 B 为 0.1%的甲酸乙腈；体积流量 400 μL/min，柱温 40 ℃，进样量 1 μL；洗脱梯度：0～0.25 min，2% B；0.25～10 min，2%～98% B；10～13.1 min，98%～2% B。质

谱采集在正、负离子模式下进行：毛细管电压分别为 2 500 V 和−2 000 V，锥孔电压 30 V，离子源温度 100 ℃，脱溶剂气温度 500 ℃，反吹气体积流量 50 L/h，脱溶剂气体积流量 800 L/h；采集范围为 *m*/*z* 50～1 200。

2.3.2 代谢物数据分析 质谱原始数据由 MassLynx v4.2 系统采集，后续的数据预处理（包括峰提取、对齐与归一化）均在 Progenesis QI 平台完成。代谢物鉴定通过比对 METLIN 数据库、公共数据库及百迈客自建库实现，鉴定时母离子质量偏差设定为≤1×10^{-4}，碎片离子质量偏差控制在≤5×10^{-4} 以内。

2.3.3 差异积累代谢物分析 将成功鉴定的全部代谢物用于多元统计分析。首先采用主成分分析（principal component analysis，PCA）评估各处理组代谢物的整体差异与聚类趋势；在此基础上构建正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）监督模型，获取各代谢物的变量投影重要性值（variable importance in projection，VIP），根据分组信息，计算并比较差异倍数（fold change，FC），用 *t* 检验计算各化合物的差异显著性（*P*）。在本研究中，对 3 种光周期处理采用两两比较来筛选差异积累代谢物（differentially accumulated metabolites，DAMs）。其中，SD *vs* DN 比较时以 SD 为比较组、DN 为对照组；同理，分别对 DN *vs* LD 与 SD *vs* LD 的进行比较。差异筛选阈值设定为 VIP≥1、*P*＜0.05，且满足 FC≥2 或 FC≤0.5。

2.4 转录组分析

2.4.1 不同光周期处理条件下的无参转录组测序 按天根总 RNA 提取试剂盒（DP762-T1C）提取步骤提取各样品总 RNA。使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 纯度与浓度，并采用 Agilent 2100/LabChip GX 精确检测 RNA 完整性。检测合格的 RNA 用于文库构建。文库构建完成后，先使用 Qubit 3.0 荧光定量仪进行初步定量，随后用 Qsep400 系统检测插入片段大小，最终通过 qPCR 测定文库有效浓度，确保其＞2 nmol/L。

2.4.2 RNA-seq 组装与功能注释 测序获得的原始读数（raw data）先进行质量控制，获得干净序列（clean date），随后使用 Trinity 软件对测序 reads 进行无参组装获得 unigene 序列[9]。随后利用 DIAMOND 将 unigene 与非冗余蛋白数据库（Non-Redundant Protein Sequence Database，NR）、瑞士蛋白数据库（UniProtKB/Swiss-Prot，Swiss-Prot）、直系同源蛋白簇（clusters of orthologous groups of proteins，COG）、真核生物直系同源蛋白簇（euKaryotic orthologous groups，KOG）、基因进化谱系：非监督直系同源簇（4.5 版本）（Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups 4.5，eggNOG 4.5）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）等数据库进行比对以获得功能注释；通过 KOBAS 获取 KEGG Orthology（KO）注释结果。采用 InterProScan 进行结构域整合分析并获得基因本体（gene ontology，GO）注释，同时使用 HMMER 与 Pfam 数据库比对获得蛋白结构域注释。序列比对的 *E*-value 阈值设定为≤1×10^{-5}，HMMER 比对的 *E*-value 阈值设定为≤1×10^{-10}。

2.4.3 差异表达基因分析 使用 Bowtie 将测序 reads 比对至 Unigene 库，结合 RSEM 进行表达量水平估计。使用 FPKM 值对应 Unigene 的表达丰度。基于基因在各个样本中的 count 值，利用 DESeq2 软件进行差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）分析，通过对 *P* 值进行校正得到错误发现率（false discovery rate，FDR），筛选标准为 FDR＜0.01、FC≥2 或 FC≤0.5。

2.5 转录组与代谢组联合分析

为探究不同光周期下黄酮差异积累的分子机制，本研究采用 KEGG 通路共映射与 Pearson 相关性分析相结合的多组学联合分析策略。首先，基于黄酮代谢通路中 DEGs 和 DAMs 的筛选结果，将 DEGs 和 DAMs 共同映射至 KEGG 的黄酮生物合成相关通路图上，保留成功映射至黄酮相关通路的候选 DEGs 和 DAMs 用于后续关联分析（本研究共获得 12 个 DEGs 与 13 个 DAMs）。随后，构建基因表达矩阵（FPKM）与代谢物相对含量矩阵（SD、DN、LD 共 9 个样本，每组 *n*＝3），并在基迪奥云平台中进行基因-代谢物之间的 Pearson 相关性分析。相关性结果以热图进行可视化展示，用于揭示基因表达变化与代谢物积累之间的潜在关系。

2.6 转录因子分析

为筛选可能参与不同光周期处理下黄酮生物合成相关基因表达变化的转录因子，基于 PlantTFDB 数据库对转录组结果进行转录因子预测、分类与注释，并筛选差异表达转录因子。随后将差异表达转录因子与 KEGG 注释的黄酮生物合

成通路差异表达结构酶基因进行 Pearson 相关性分析，筛选相关系数（r）≥0.9 且 P＜0.05 的转录因子—基因对。Pearson 相关性分析已被用于黄酮生物合成相关转录因子的初步筛选与候选调控关系挖掘[10]。结合 PlantTFDB 提供的转录因子家族信息，使用 Cytoscape 3.9.1 构建转录因子—结构基因表达相关性网络。

2.7 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）及表达验证

总 RNA 提取与 cDNA 合成分别按北京全式金生物技术有限公司 TransZol Up RNA 试剂盒和 EasyScript®One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书进行操作。采用 qRT-PCR 对基因表达进行验证，以 *GAPDH* 基因为内参[11]。每个处理设 3 个生物学重复，每个样品进行 3 次技术重复。qRT-PCR 具体实验流程参照 Shen 等[12]方法。基因扩增引物序列见表 1。

2.8 统计分析

本研究各处理均设置 3 个生物学重复，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析（ANOVA）检验，P＜0.05 代表差异具有统计学意义；相关性分析采用 Pearson 相关性分析。统计分析使用 SPSS 26.0 完成，图表绘制与排版使用 Origin 2024 和 Adobe Illustrator 2020 完成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	正向引物 (5’→3’)	反向引物 (5’→3’)
BZ1	CGGGTAACTTTGTGGAGGTGA	AAACATGAGCCGACAGGGA
4CL	TGTCAGTGGCGTCCGTAGAA	AAGCAGTAGTCGTGGAGTGGG
CHS	GCCGCTGTTCCAGATTGTC	CCTCAGGCTCTTCTCGATGTT
PAL	ACGGACCACTTGACCCACA	TGACCGAATTGATTTCCCTCT
HCT	AAACGACCAACTAAACGGTCTC	GGGACAAGGTGACGGTGAAT
FNS II	TCCGATCCCGATGTTGTCG	CGAAATGCTGCCCTTTGATG
GAPDH	TGGCATTGTCGAAGGCCTCA	AGCCCTTCCACCTCTCCAGT

GAPDH 为内参基因。

GAPDH was used as the internal reference gene.

3 结果与分析

3.1 生根体系优化

沙氏鹿茸草在不同基本培养基上的生根情况存在显著差异（表 2）。结果表明，沙氏鹿茸草组培苗在 WPM 培养基上表现出显著优于其他 4 种培养基的生根效果，其平均生根条数和生根率均为最高。而 N6 培养基则表现最差，平均生根条数和生根率均为最低。

NAA 和 IBA 对沙氏鹿茸草的生根效果亦存在显著差异（表 3）。其中，1.0 mg/L 的 NAA 使沙氏鹿茸草组培苗的平均生根条数达到（11.50±0.18）条，生根率由 64.17%提升至 100%；1.0 mg/L 的 IBA 处理可使组培苗的生根率提高至（80.01±1.43）%，但提升幅度较小，低于相同浓度的 NAA 处理。

表 2 不同基本培养基对沙氏鹿茸草生根情况的影响

Table 2 Effects of different basal media on rooting in *M. savatieri*

培养基	平均生根条数	生根率/%
MS	0.36±0.03^{c}	13.67±6.02^{b}
1/2MS	0.32±0.01^{d}	17.33±4.62^{b}
B5	0.48±0.06^{b}	11.67±1.53^{b}
N6	0.15±0.04^{e}	4.33±3.79^{c}
WPM	3.03±0.12^{a}	50.67±4.04^{a}

不同小写字母表示相同指标内差异显著（P＜0.05），下表同。

Different lowercase letters indicate significant differences within the same parameter (P < 0.05), same as tables.

表 3 2 种激素处理及不同激素浓度对沙氏鹿茸草组培苗生根情况的影响

Table 3 Effects of two hormone treatments and different hormone concentrations on rooting of tissue-cultured plantlets of *M. savatieri*

激素种类	质量浓度/(mg·L^{-1})	平均生根条数	生根率/%
对照	0.0	2.16±0.23^{e}	64.17±3.82^{d}
NAA	0.1	5.45±0.08^{c}	96.21±1.68^{b}
	0.5	8.10±0.10^{b}	100.00±0.00^{a}
	1.0	11.50±0.18^{a}	100.00±0.00^{a}
IBA	0.1	2.28±0.17^{e}	62.86±3.12^{d}
	0.5	3.05±0.21^{e}	62.86±2.86^{d}
	1.0	4.98±0.06^{d}	80.01±1.43^{c}

不同小写字母表示相同指标内差异显著（P＜0.05）。

Different lowercase letters indicate significant differences within the same parameter (P < 0.05).

3.2 光周期处理的代谢物鉴定

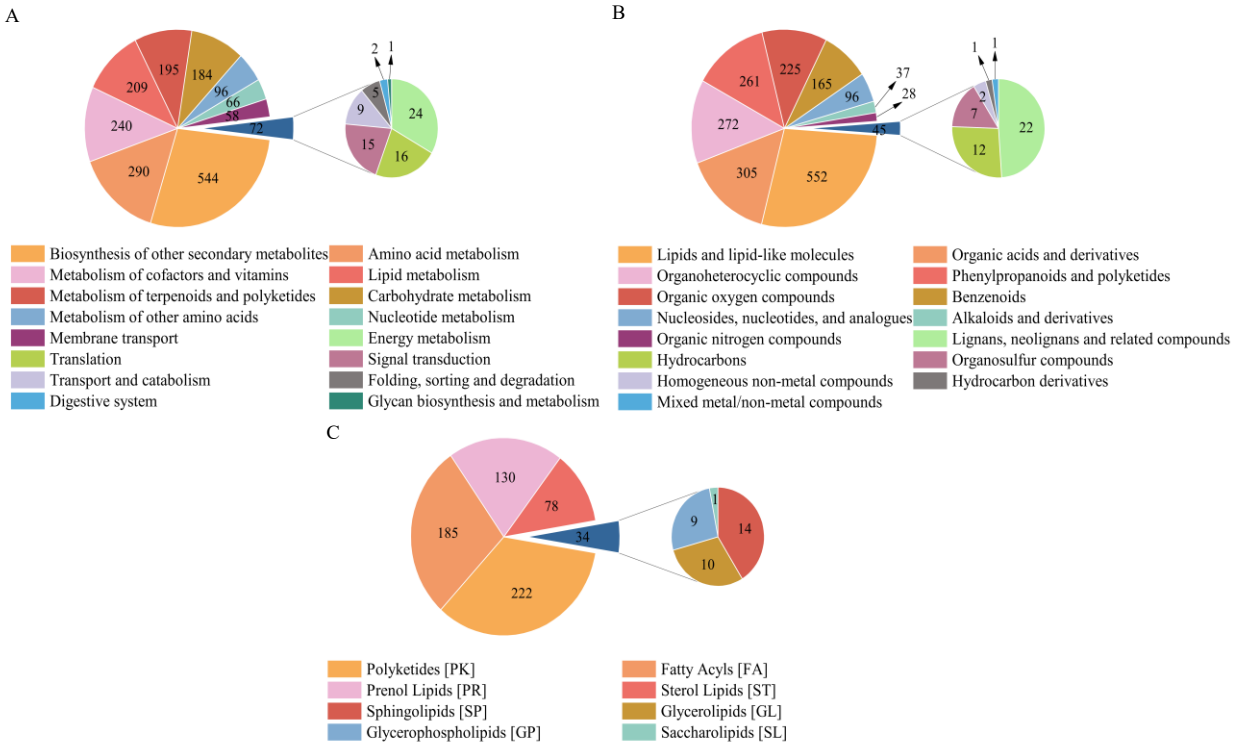
通过非靶向代谢组学检测，共获得 4 328 个代谢物注释结果，这些代谢物分别在 KEGG、HMDB 及 LIPID MAPS 数据库中进行注释与分类。在

KEGG 数据库中共注释 1 954 个代谢物，主要涉及其他次级代谢产物的生物合成（biosynthesis of other secondary metabolites）、辅因子与维生素代谢（metabolism of cofactors and vitamins）以及氨基酸代谢（amino acid metabolism）等通路（图 1-A）。在 HMDB 数据库中共注释 1 986 个代谢物，其化学类别主要包括脂类及类脂分子（lipids and lipid-like molecules）、有机酸及其衍生物（organic acids and derivatives）和有机杂环化合物（organoheterocyclic compounds）等（图 1-B）。在 LIPID MAPS 数据库中共注释 649 个代谢物，主要分属于多酮类（polyketides，PK）、脂肪酰类（fatty acyls，FA）和异戊二烯脂类（prenol lipids，PR）等（图 1-C）。黄酮类代谢物基于 HMDB 与 LIPID MAPS 数据库注释结果进行筛选；亚类统计以 LIPID MAPS 数据库分类为主，HMDB 用于补充 LIPID MAPS 未注释但可确认的黄酮类化合物。最终筛选得到 225 个黄酮类化合物及其衍生物，在鉴定出的黄酮类物质中，占比最多的是黄酮与黄酮醇类，占比 53.78%，其次是黄烷酮类，占 13.78%，而异黄烷类占比最少，仅 1.78%（图 2）。

3.3　沙氏鹿茸草差异代谢物分析

全部代谢物的 PCA 结果显示，代谢物在不同光周期处理组间呈现清晰分离（图 3-A）。进一步利用 OPLS-DA 对 3 个处理组进行两两比较，观察到稳定的代谢差异。且在 SD *vs* DN、DN *vs* LD 以及 SD *vs* LD 的比较中，R^2_X 均大于 0.694、R^2_Y 均大于 0.988、Q^2_Y 均大于 0.928（图 3-B～D），提示模型拟合度与预测能力良好，分组差异具有统计学与生物学一致性。

通过对全部代谢物的筛选，在 SD *vs* DN 比较组中，共识别了 451 个差异代谢物（上调 351 个，下调 100 个）；在 DN *vs* LD 比较组中，共识别了



A-KEGG 分类；B-HMDB 分类；C-LIPID MAPS 分类。

A-KEGG classification; B-HMDB classification; C-LIPID MAPS classification.

图 1　不同光周期处理下的代谢物注释与分类

Fig. 1　Metabolite annotation and classification under different photoperiod treatments

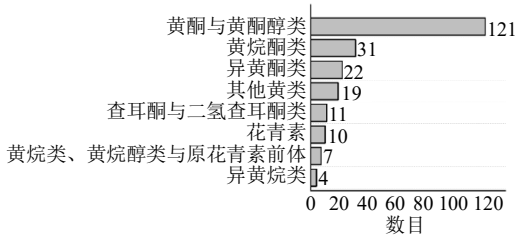


图 2　沙氏鹿茸草黄酮类代谢物分类

Fig. 2　Classification of flavonoid metabolites in *M. savatieri*

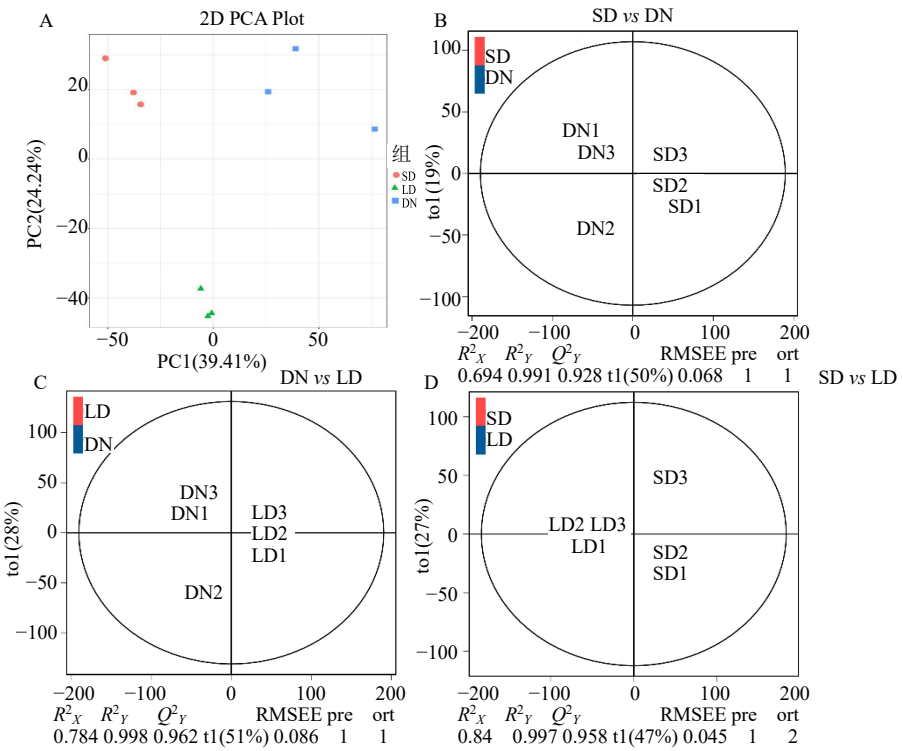


图 3　不同光周期处理下的代谢组数据多变量统计分析

Fig. 3　Multivariate statistical analysis of metabolomic data under different photoperiod treatments

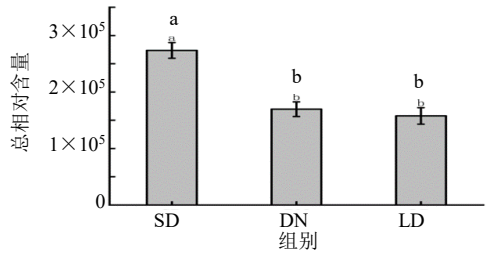
470 个差异代谢物（上调 178 个，下调 292 个）；在 SD *vs* LD 比较组中，共识别了 282 个差异代谢物（上调 182 个，下调 100 个）。在 3 个光周期处理比较组中，与黄酮类相关的差异代谢物有 42 个，包括芦丁、槲皮素-3-β-*D*-葡萄糖苷、3-*O*-甲基槲皮素、矢车菊苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、7,4′-二羟基黄酮等。以短日照为对照时，中日照处理中共有 22 个代谢物相对含量显著降低，如 7,4′-二-*O*-甲基圣草酚、槲皮苷、甘草糖苷 C2 等，共有 6 个代谢物相对含量显著升高，如甘草素III、7,4′-二羟基黄酮、樱花苷等；以中日照为对照时，长日照处理中共有 19 个代谢物相对含量显著升高，其中槲皮素 3-*O*-(6-*O*-丙二酰基-β-*D*-葡萄糖苷)的差异变化最显著；而以短日照为对照时，长日照处理中共有 3 个代谢物相对含量显著升高、4 个代谢物相对含量显著降低，差异代谢物数量相对较少，黄酮类差异代谢物热图见图 4。从 3 组光周期处理条件的相对含量来看，部分黄酮代谢物在短日照与长日照条件下均维持较高相对含量，而在中日照条件下相对含量最低，包括芦丁、矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷、新橙皮苷、橘皮素、槲皮素-4′-葡萄糖醛酸苷、异槲皮苷等；在短日照处理中相对含量较高的有芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡



图 4　黄酮类差异积累代谢物热图

Fig. 4　Heatmap of differentially accumulated flavonoid metabolites

萄糖苷、7,4′-二-*O*-甲基圣草酚、3-羟基葛根醇等；在中日照处理中相对含量较高的有 6-香叶基芹菜素、矢车菊苷、7,4′-二羟基黄酮等；在长日照处理中相对含量较高的有甘草素 III、白杨素、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷等。综合黄酮类差异代谢物的积累特征及差异黄酮类总相对含量结果，在 3 种光周期处理中，SD 处理更有利于黄酮类成分的整体积累，见图 5。



不同字母表示差异显著 $P<0.05$。

Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

图 5　不同光周期处理对差异积累代谢物总相对含量的影响

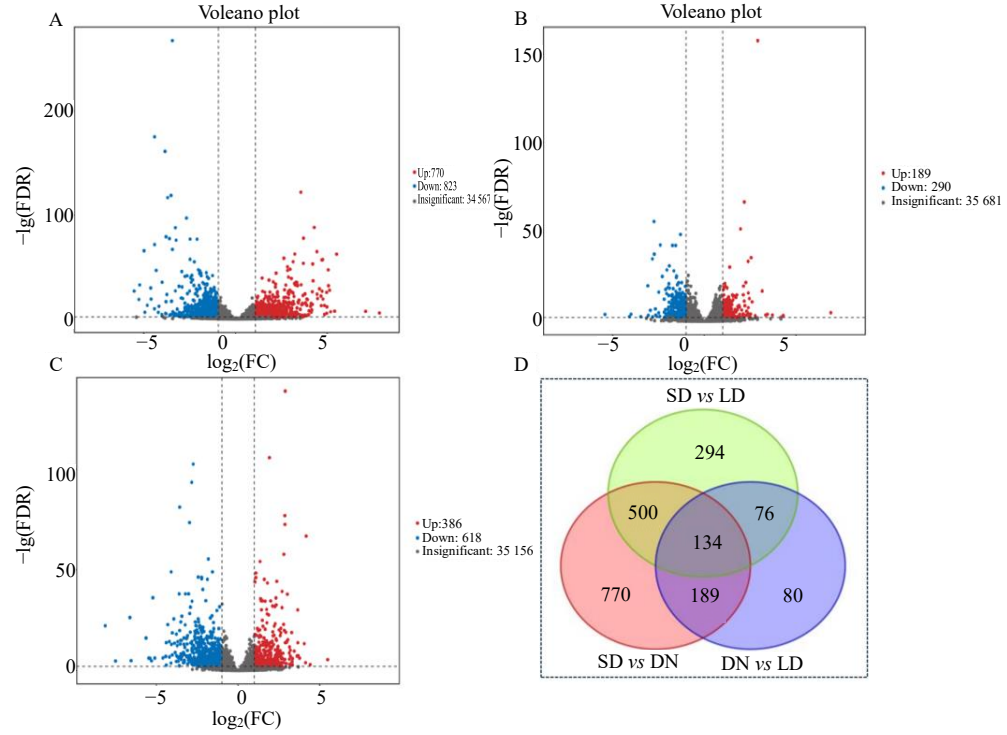
Fig. 5　Effects of different photoperiod treatments on total relative content of differentially accumulated metabolites

3.4　RNA-Seq 组装与功能注释

对不同光周期处理组样品进行转录组测序与质控后，共获得 57.52 Gb 的 clean data。组装得到 36 160 条 Unigene，平均长度 1 365.01 bp，N_{50} 为 2 397 bp。各样品 Q_{30}≥97.13%，GC 含量为 46.64%～46.95%，表明测序与组装质量满足后续分析需求。进一步将 36 160 条 Unigene 比对至 9 个公共数据库，在 TrEMBL、NR、eggNOG、GO、Pfam、Swiss-Prot、KEGG、KOG 和 COG 数据库中共获得 20 846 条注释信息（占 57.65%）。其中，TrEMBL 注释数最多（20 533，56.78%），NR 次之（20 477，56.63%），COG 最少（5 889，16.28%）。

3.5　差异表达基因分析

以 FC≥2 且 FDR＜0.01 为阈值筛选 DEGs。在 SD *vs* DN 组中，DEGs 数量最多，有 1 593 个（上调 770 个、下调 823 个）（图 6-A），说明短日照与中日照之间的光周期差异对沙氏鹿茸草基因表达调控具有显著影响；在 DN *vs* LD 组中，DEGs 数量最少，仅有 479 个（上调 189 个、下调 290 个）（图 6-B），表明中日照与长日照间的光周期差异对基因



A-SD *vs* DN 之间的差异表达基因火山图；B-DN *vs* LD 之间的差异表达基因火山图；C-SD *vs* LD 之间的差异表达基因火山图；D-不同比较中之间差异表达基因的韦恩图。

A-Volcano plot of differentially expressed genes between SD and DN; B-Volcano plot of differentially expressed genes between DN and LD; C-Volcano plot of differentially expressed genes between SD and LD; D-Venn diagram of differentially expressed genes across the different comparisons.

图 6　不同光周期处理下沙氏鹿茸草差异表达基因分析

Fig. 6　Differentially expressed gene analysis of *M. savatieri* under different photoperiod treatments

表达的影响相对较小；此外，SD *vs* LD 组中 DEGs 数量 1 004 个，且下调 DEGs 有 618 个（图 6-C），提示从短日照转为长日照时，一部分在短日照条件下高表达的基因可能受到抑制。维恩图进一步显示（图 6-D），SD *vs* DN 与 DN *vs* LD、SD *vs* DN 与 SD *vs* LD 和 SD *vs* LD 与 DN *vs* LD 比较组中共有的 DEGs 分别为 323、634 和 210 个，3 个比较组中存在 134 个共同的 DEGs。

3.6 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

DEGs 的 KEGG 富集结果显示（图 7-A），在

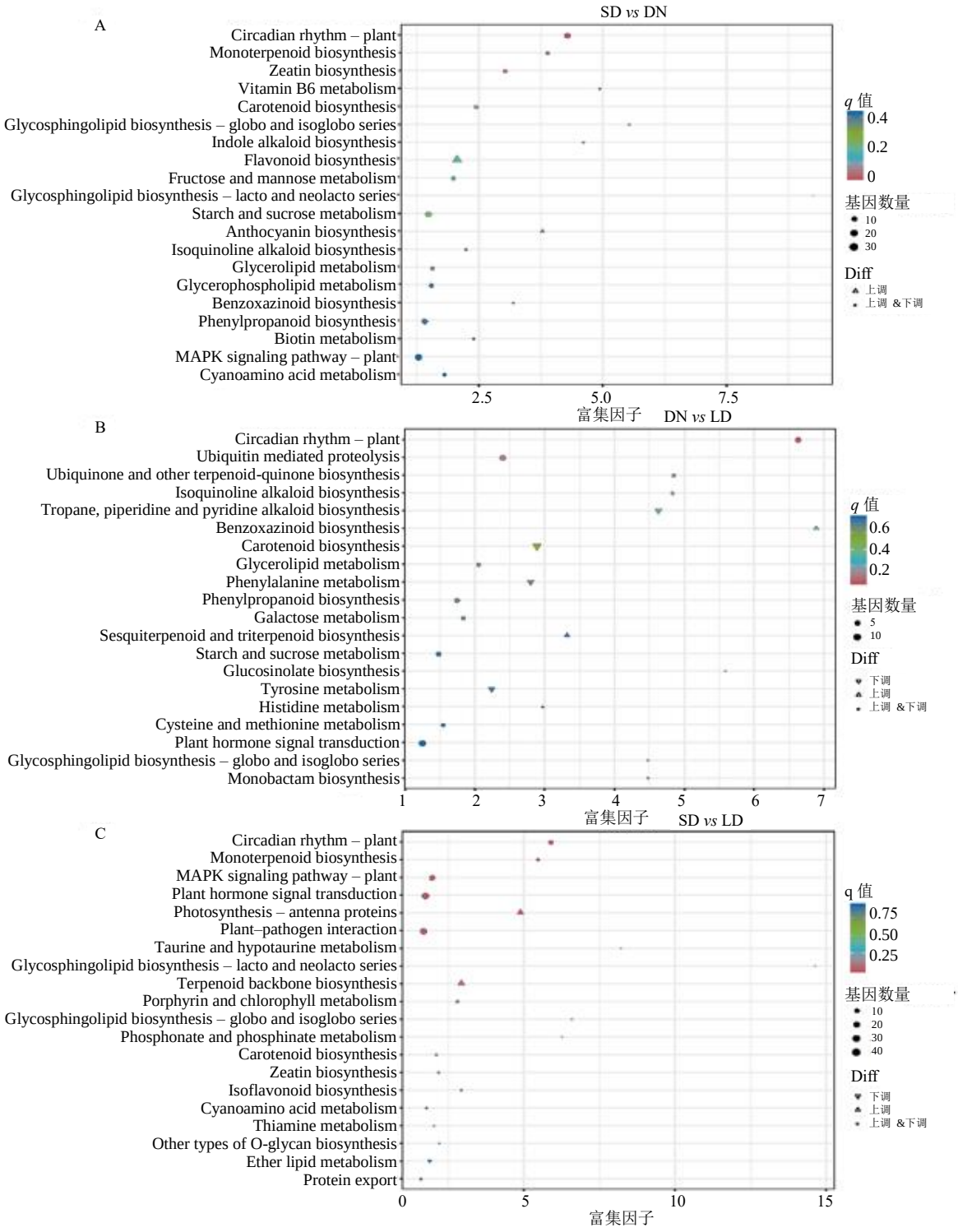


图 7 基于差异表达基因的前 20 个 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 Top 20 KEGG pathway enrichment analysis based on differentially expressed genes

SD *vs* DN 中，DEGs 显著富集于 MAPK 信号通路（MAPK signaling pathway-plant）、淀粉和蔗糖代谢（Starch and sucrose metabolism）以及植物昼夜节律（circadian rhythm-plant）等通路；值得注意的是，类黄酮生物合成（flavonoid biosynthesis）和花青素生物合成（anthocyanin biosynthesis）相关基因呈现整体上调趋势。在 DN *vs* LD 中，DEGs 主要富集于植物激素信号转导（plant hormone signal transduction）、植物昼夜节律（circadian rhythm-plant）和泛素介导的蛋白水解（ubiquitin mediated proteolysis）等通路；同时，苯氧杂蒽酮生物合成（benzoxazinoid biosynthesis）以及倍半萜和三萜生物合成（sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis）途径显著上调，而类胡萝卜素生物合成（carotenoid biosynthesis）、苯丙烷生物合成（phenylpropanoid biosynthesis）和酪氨酸代谢（tyrosine metabolism）等途径显著下调（图 7-B）。在 SD *vs* LD 中，DEGs 显著富集于植物激素信号转导、植物-病原体相互作用（plant-pathogen interaction）和 MAPK 信号通路等；其中，光合作用天线蛋白（photosynthesis-antennaproteins）、萜类骨架生物合成（terpenoid backbone biosynthesis）和异黄酮生物合成（isoflavonoid biosynthesis）途径相关基因呈现上调趋势，而磷和膦酸盐代谢（Phosphonate and phosphinate metabolism）、其他类型 *O*-糖基化生物合成（other types of *O*-glycan biosynthesis）和醚脂代谢（ether lipid metabolism）途径的相关基因则呈现下调趋势（图 7-C）。

3.7 黄酮类生物合成相关的 DEGs 筛选

进一步筛选黄酮合成途径相关 DEGs，共筛选出 21 个 DEGs。在苯丙素生物合成发现 4 个编码 3 种酶的 DEGs，包括 1 个苯丙氨酸解氨酶（phenylalanine ammonia-lyase，PAL）、1 个肉桂酸-4-羟化酶（*trans*-cinnamate 4-monooxygenase，C4H）和 2 个 4-香豆酸辅酶 A 连接酶（4-coumarate-CoA ligase，4CL）；类黄酮合成途径中发现到 12 个 DEGs，编码 8 种酶，分别为 1 个咖啡酰辅酶 A-*O*-甲基转移酶（caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase，CCOAOMT）、1 个查耳酮合酶（chalcone synthase，CHS）、1 个查耳酮异构酶（chalcone isomerase，CHI）、1 个黄酮醇合酶（flavonol synthase，FLS）、1 个黄酮 3′-单加氧酶（flavonoid 3′-monooxygenase，F3′H）、1 个 5-*O*-(4-香豆酰)-*D*-奎宁酸 3′-单加氧酶 [5-*O*-(4-coumaroyl)-*D*-quinate 3′-monooxygenase，C3′H]、5 个对莽草酸羟基肉桂酰基转移酶（shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase，HCT）、1 个黄酮合成酶 II（flavone synthase II，FNS II）；花青素合成途径中发现 3 个 DEGs，编码 3 种酶，包括 1 个花青素 3-*O*-葡糖基转移酶（anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase，*BZ1*）、1 个花青素 3-*O*-葡萄糖苷 2‴-*O*-木糖基转移酶（anthocyanidin 3-*O*-glucoside 2‴-*O*-xylosyltransferase，*UGT79B1*）和 1 个花青素 3-*O*-葡萄糖苷 6″-*O*-酰基转移酶（anthocyanidin 3-*O*-glucoside 6″-*O*-acyltransferase，*3AT*）；异黄酮合成途径中，发现 2 个 DEGs，编码异黄酮/4′-甲氧基异黄酮 2′-羟化酶（isoflavone/4′-methoxyisoflavone 2′-hydroxylase，*I2′H*）这 1 种酶。在不同光周期比较组中，SD *vs* DN 比较组中有 18 个 DEGs 上调，包括 *C4H*、*BZ1*、*F3′H*、*4CL1*、*4CL2*、*CHS*、*FNS II*、*PAL* 和 *CHI* 等关键结构基因，提示这些基因在 DN 处理下的表达水平高于 SD 处理；DN vs LD 比较组中有 3 个 DEGs，其中 *CCOAOMT* 上调表达，而 *4CL1* 和 *4CL2* 下调表达；SD *vs* LD 比较组中有 6 个 DEGs，这些基因中 *3AT*、*HCT3*、*I2′H1*、*CHS* 和 *I2′H2* 上调表达，而 *HCT4* 下调表达。总体来看，不同光周期处理下黄酮生物合成相关的 DEGs 表达模式存在差异，其中 SD 与 DN 处理间差异表达基因数量变化最明显，SD 与 LD 处理间次之，DN 与 LD 处理间差异相对较小，差异表达基因热图见图 8。

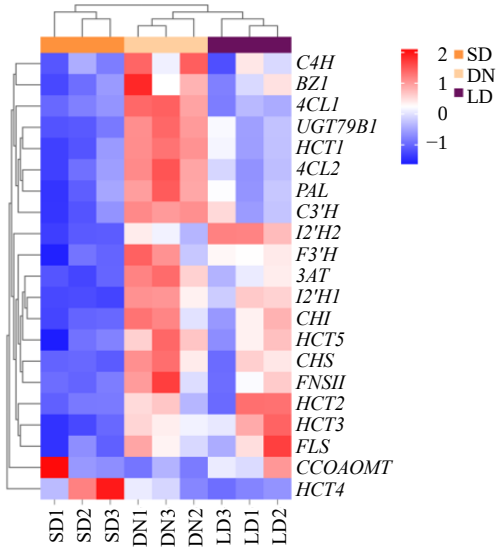
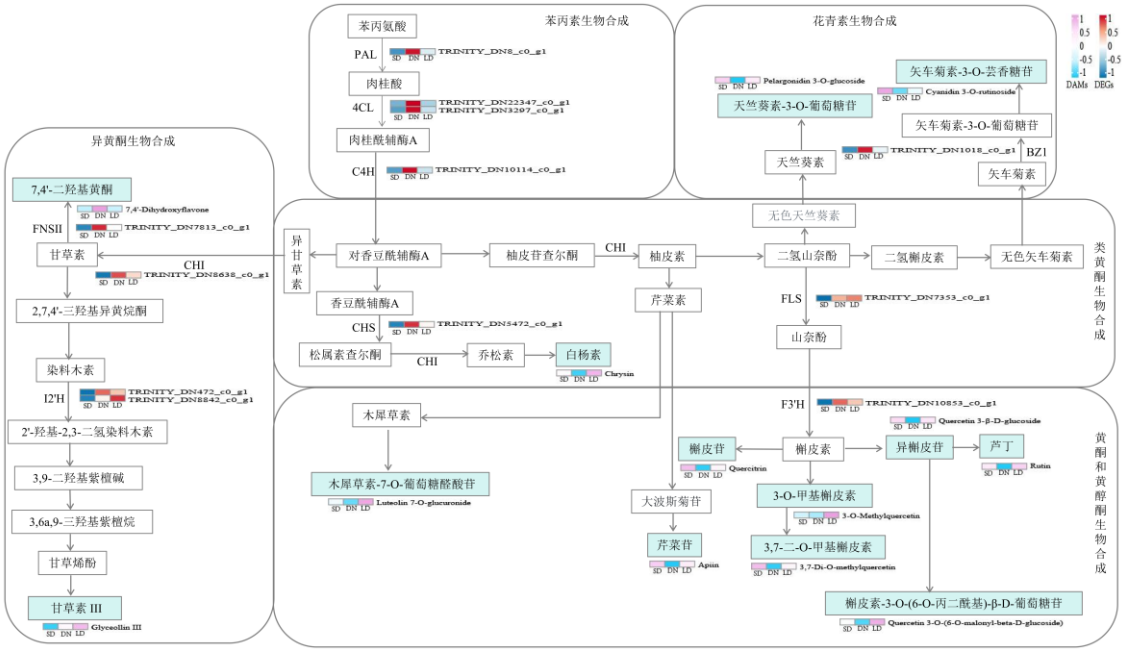


图 8 差异表达基因热图

Fig. 8 Heat map of differentially expressed genes

3.8 转录组和代谢组联合分析

为了解沙氏鹿茸草在不同光周期处理下黄酮的差异积累机制，本研究整合了转录组和代谢组的联合分析，探讨了黄酮生物合成途径中的差异代谢物与差异基因之间的通路关系，见图 9。本研究在黄酮类相关的 KEGG 通路图中映射到 13 个 DAMs，包括白杨素、天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷（pelargonidin 3-*O*-glucoside）、矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷、7,4′-二羟基黄酮、甘草素III（glyceollin III）、槲皮苷、异槲皮苷、芦丁、3-*O*-甲基槲皮素、3,7-二-*O*-甲基槲皮素（3,7-di-*O*-methylquercetin）、芹菜苷（apiin）、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和槲皮素-3-*O*-(6-*O*-丙二酰基)-β-*D*-葡萄糖苷[quercetin 3-*O*-(6-*O*-malonyl-β-*D*-glucoside)]。此外，在黄酮类相关生物合成途径中还映射到 12 个 DEGs，包括 *4CL1*、*4CL12*、*I2′H1*、*I2′H2*、*PAL*、*C4H*、*CHS*、*CHI*、*FNS II*、*FLS*、*BZ1* 和 *F3′H*。进一步对 13 个 DAMs 和 12 个 DEGs 进行 Pearson 相关性分析，见图 10。结果显示，映射到黄酮相关通路的差异表达基因与差异积累代谢物之间存在显著相关性。芦丁的相对含量与 *4CL1* 的表达量显著负相关；天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷和异槲皮苷的相对含量分别与 *C4H*、*BZ1*、*4CL1*、*4CL2* 和 *PAL* 的表达量显著负相关；芹菜苷的相对含量与 *4CL1* 和 *4CL2* 的表达量显著负相关；3,7-二-*O*-甲基槲皮素的相对含量与 *C4H*、*4CL1*、*4CL2* 和 *PAL* 的表达量显著负相关；矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷的相对含量与 *C4H*、*BZ1*、*F3′H*、*4CL1*、*4CL2*、*I2′H1*、*CHS*、*PAL* 和 *CHI* 的表达量显著负相关；槲皮苷与 *BZ1*、*4CL1*、*4CL2* 和 *PAL* 的表达量显著负相关；7,4′-二羟基黄酮与 *C4H*、*BZ1*、*4CL1*、*4CL2* 和 *PAL* 的表达量显著正相关。



DAMs 代表差异积累代谢物；DEGs 代表差异表达基因；热图显示了 DAMs 和 DEGs 的表达水平，紫粉色和红色代表高表达水平，蓝青色和蓝色代表低表达水平；浅蓝色框中的代谢物代表成功映射到 KEGG 的 DAMs。

DAMs represent differentially accumulated metabolites, and DEGs represent differentially expressed genes. The heatmap shows the expression levels of DAMs and DEGs, where purple-pink and red indicate high expression, and cyan-blue and blue indicate low expression. Metabolites highlighted with a light blue box represent DAMs successfully mapped to KEGG.

图 9 沙氏鹿茸草不同光周期处理条件的黄酮类代谢途径差异分析

Fig. 9 Analysis of differences in flavonoid metabolic pathways of *M. savatieri* under different photoperiod treatments

3.9 转录因子分析

沙氏鹿茸草不同光周期处理条件的转录组数据中共有 546 个 unigenes 被注释为转录因子（transcription factor，TF），它们被分为 50 个转录因子家族。其中排名前 10 的转录因子家族主要包括：*ERF*、*bHLH*、*WRKY*、*MYB* 和 *NAC* 等，结果如表 4 所示。通过 Pearson 相关性分析（$r \geq 0.9$ 且 $P < 0.05$），预测出 14 个转录因子家族可能参与光周期处理条件下类黄酮代谢酶基因表达的调控，分别为 *AP2*、*bHLH*、*bZIP*、*C2H2*、*DBB*、*Dof*、*G2-like*、*GATA*、*GRF*、*HD-ZIP*、*MYB_related*、*TALE*、*Trihelix* 和 *WRKY*。具体而言，*AP2* 家族的 unigene 与 *CHI*

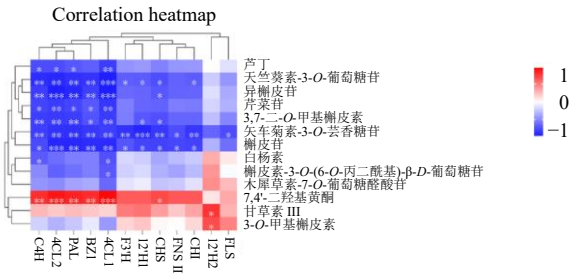


图 10　映射到 KEGG 通路的黄酮类相对含量和结构基因的相关性热图分析

Fig. 10　Correlation heatmap analysis between relative content of flavonoid metabolites mapped to KEGG pathways and structural genes

表 4　排名前 10 的转录因子家族

Table 4　Top 10 transcription factor families

排名	转录因子家族	数目
1	*ERF*	52
2	*bHLH*	47
3	*WRKY*	35
4	*MYB*	34
5	*NAC*	32
6	*C2H2*	27
7	*GRAS*	27
8	*bZIP*	23
9	*FAR1*	21
10	*MYB-related*	21

和 *PAL* 的表达量呈显著相关性；*bHLH* 家族的 unigene 与 *4CL1*、*4CL2*、*I2'H1* 和 *F3'H* 的表达量呈显著相关性；*bZIP* 家族的 unigene 与 *CHS*、*I2'H1*、*4CL1*、*4CL2* 和 *CHI* 的表达量呈显著相关性；*C2H2* 家族的 unigene 与 *4CL2* 和 *PAL* 的表达量呈显著相关性；*DBB* 家族的 unigene 与 *4CL1*、*4CL2*、*F3'H* 和 *I2'H1* 基因的表达量呈显著相关性；*G2-like* 家族的 unigene 与 *4CL2*、*PAL* 和 *I2'H1* 的表达量呈显著相关性；*GATA* 家族的 unigene 与 *4CL2* 基因的表达量呈显著相关性；*GRF* 家族的 unigene 与 *CHI*、*FLS*、*FNS II*和 *CHS* 的表达量呈显著相关性；*HD-ZIP* 家族的 unigene 影响 *FNS II*和 *CHS* 的基因表达；*MYB_related* 家族的 unigene 对 *CHS*、*CHI*、*FNS II*、*PAL*、*FLS*、*4CL1*、*4CL2*、*I2'H1* 和 *F3'H* 基因的表达量呈显著相关性；*TALE* 家族的 unigene 与 *FLS* 和 *CHI* 的表达量呈显著相关性；*Trihelix* 家族的 unigene 与 *I2'H1* 基因的表达量呈显著相关性；*WRKY* 家族的 unigene 对 *CHS*、*CHI*、*FNS II*、*4CL* 和 *I2'H1* 的表达量呈显著相关性。上述关系基于 Pearson 相关性分析获得，反映的是潜在调控关系，仍需进一步实验验证。相关调控关系见图 11。

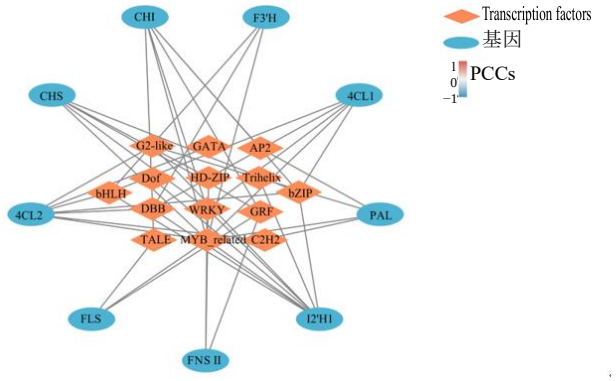


图 11　光周期处理条件相关转录因子与酶基因调控关系图

Fig. 11　Regulatory relationships between photoperiod-responsive transcription factors and enzyme genes

3.10　qRT-PCR 对转录组测序结果的验证

为了验证 RNA-seq 数据的准确性，本研究随机选取了 6 个与黄酮生物合成有关的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证，分别为 *HCT3*、*PAL*、*BZ1*、*FNS II*、*4CL2* 和 *CHS*，将这 6 个基因的相对表达量与 *GAPDH* 基因的表达量归一化。结果显示，qRT-PCR 水平与 RNA-seq 数据中获得的基因表达模式一致（图 12），说明 RNA-seq 分析结果是可靠的，为解析光周期调控下黄酮类活性成分的分子机制提供了可靠依据。

4　讨论

黄酮类化合物是一类重要的植物次生代谢产物，广泛分布于植物的根、茎、叶、花及种子等组织中[13]，在多种生理过程及环境胁迫中发挥关键作用，其生物合成积累受光照、温度、气候、地域等多种因素影响[14]。黄酮类化合物在植物中发挥抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多重生物活性，是植物应对逆境胁迫的重要物质基础[15]。光周期可影响黄酮类化合物的积累，但在不同植物之间，黄酮类生物合成与积累的方向常受物种差异、组织类型以及培养阶段等因素影响而呈现出不一致[16-18]。

本研究以组培生根体系优化得来的组培苗为研究材料，通过非靶向代谢组学技术，在不同光周期处理下共有 42 个黄酮类差异积累代谢物，其中芦丁、矢车菊素苷、新橙皮苷、槲皮素 4-葡萄糖醛酸苷、异槲皮苷等在短日照与长日照处理条件下均维持较高相对含量，而在中日照处理条件下相对含量最低。有研究表明，芦丁与槲皮素类黄酮醇及其糖苷具有较强的清除活性氧能力[19]，能够参与活性氧稳态调控并与植物非生物胁迫耐受相关[20-21]，因

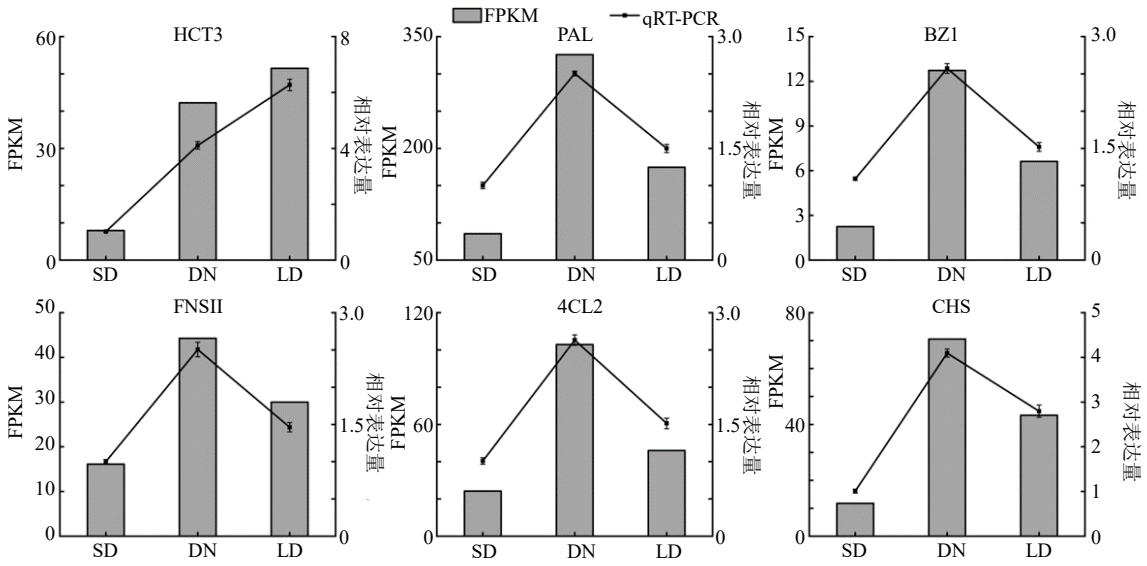


图 12　结构候选基因表达水平的 qRT-PCR 验证

Fig. 12　qRT-PCR validation of expression levels of structural candidate genes

此在短日照与长日照条件下的较高积累，更可能反映沙氏鹿茸草组培苗在不同光周期背景下对细胞保护与胁迫缓冲能力的需求，而非呈现随光周期变化的累积规律。芹菜素 7-葡萄糖苷、7,4-二-*O*-甲基圣草酚、3-羟基葛根醇等在短日照处理下相对含量较高。其中芹菜素 7-葡萄糖苷具有组织保护与抗炎相关潜力[22]，7,4-二-*O*-甲基圣草酚具有抗癌活性[23]，对于 3-羟基葛根醇这类来源于甘草类的异戊烯基化黄酮成分，多与抗炎及免疫调节效应相关[24]。另外，6-香叶基芹菜素、矢车菊苷、7,4-二羟基黄酮等在中日照处理下相对含量较高。研究显示，6-香叶基芹菜素具有抑制炎症反应的能力[25]，矢车菊苷可影响肠道脂质消化吸收过程[26]，7,4-二羟基黄酮可抑制嗜酸性粒细胞趋化因子的产生，从而参与炎症调控[27]。长日照相对含量较高的包括甘草素III、白杨素、木犀草素 7-*O*-葡萄糖醛酸苷等代谢物，多为修饰型或更稳定的黄酮类衍生物。甘草素III是一种多靶点的天然化合物，在治疗癌症、抗炎、代谢疾病和微生物感染防治中均存在生物活性[28]，白杨素因羟基的存在，有利于自由基的中和作用和细胞内信号通路的调节，具有抗氧化、抗炎、抗癌、神经保护和抗焦虑作用[29]。木犀草素 7-*O*-葡萄糖醛酸苷通过抑制炎症介质的生成和干扰炎症信号通路，从而抑制炎症反应[30]。综上，不同光周期诱导的黄酮谱差异可能对应不同的生理适应策略及潜在功能指向。

此外，本研究在 KEGG 黄酮相关通路中共富集到 13 个代谢物，包括白杨素、天竺葵素-3-*O*-葡萄糖苷、矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷、7,4′-二羟基黄酮等，同时富集到 *4CL1*、*I2'H1*、*PAL*、*C4H*、*CHS*、*CHI*、*FNS II* 等 12 个结构基因；其相关性分析显示，7,4′-二羟基黄酮与 *PAL*、*C4H*、*4CL* 及 *BZ1* 呈显著正相关，提示其积累可能与黄酮生物合成途径上游结构基因的协同调控有关。*PAL*、*C4H* 和 *4CL* 是黄酮类生物合成上游苯丙烷代谢途径中的关键酶基因[31]。此外，芦丁、异槲皮苷、槲皮苷及矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷等结构基因呈显著负相关，提示稳态含量易受分流竞争与后修饰、转运储存过程共同决定[32-33]。

在植物次生代谢产物合成中，基因受多种转录因子调控。本研究中，转录因子与候选结构基因的相关性分析提示 *MYB_related*、*bHLH*、*WRKY*、*bZIP* 等多类转录因子可能协同参与光周期条件下黄酮结构基因的精细调控，该结果与已有研究中提出的“以 *MYB-bHLH-WD40* 复合体为核心，并由其他转录因子参与信号整合”的经典调控模型高度一致[34-35]。有研究表明，上述转录因子不仅能够直接调控黄酮合成相关结构基因的转录活性，还常作为光信号、昼夜节律及植物内源信号通路的重要交汇节点，从而在不同光周期或发育阶段驱动代谢通量的动态重分配[36]；另外，qRT-PCR 对部分关键结构基因的验证结果也与转录组测序数据保持一致，进一步支持了本研究转录组分析结果的可靠性。

综上所述，为了探究沙氏鹿茸草光周期处理条件下黄酮差异积累的分子机制，本研究通过对沙氏

鹿茸草 3 个光周期处理样品进行转录组学和代谢组学分析，鉴定了黄酮类差异积累密切相关的关键候选基因及转录因子，阐明了沙氏鹿茸草光周期处理下黄酮类代谢物类别及含量差异，研究结果有助于进一步深入了解沙氏鹿茸草黄酮生物合成过程和关键调控基因功能研究。该研究不仅填补了沙氏鹿茸草在光周期—黄酮代谢响应方面的空白，也为药用植物在人工光环境下实现品质精准调控提供了候选结构基因与转录因子靶点。随着后续在功能验证层面的深入推进，有望进一步阐明沙氏鹿茸草黄酮积累的关键限制步骤与可操作调控策略，并推动其在植物工厂化生产中的应用转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 谢玮, 蔡孟成, 郭良君, 等. 中药鹿茸草的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2021, 39(5): 387-390.

[2] 杨燕妮, 王毅, 孙晓波, 等. 炎宁糖浆抗炎活性及其作用机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1760-1766

[3] Li Y Q, Kong D X, Fu Y, *et al*. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 148: 80-89.

[4] Liu K Z, Gao M F, Jiang H Z, *et al*. Light intensity and photoperiod affect growth and nutritional quality of *Brassica* microgreens [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 883.

[5] 张渊博, 郝文琴, 石玉, 等. 不同光周期下外源锌对水培生菜生长和品质的影响 [J]. 中国农学通报, 2022, 38(13): 41-46.

[6] Yu J Y, Yang Y, Luo L J, *et al*. Photoperiod-dependent nutrient accumulation in rice cultivated in plant factories: A comparative metabolomic analysis [J]. *Foods*, 2024, 13(10): 1544.

[7] 董伟欣, 殷丛培, 李东晓, 等. 小豆叶片响应短日照诱导的代谢组学分析 [J]. 华北农学报, 2025, 40(4): 65-75.

[8] 胡悦, 任保青, 陈陆琴, 等. 基于 LC-MS 代谢组学技术的丽豆-大豆差异代谢物比较研究 [J]. 广西植物, 2023, 43(12): 2245-2255.

[9] 吴迪, 张燕燕, 林楠, 等. 基于代谢组学和转录组学探究草珊瑚叶和根中黄酮类成分差异积累的转录调控机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(21): 5767-5778.

[10] Yang F, Xing Q Y, Liu S Z, *et al*. Multi-omics analysis reveals ThMYB6 regulation of flavonoid biosynthesis in differently colored tuberous roots of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1642835.

[11] 郭军, 张慧, 郭巧生, 等. 沙氏鹿茸草实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1887-1892.

[12] Shen C X, Li D, He R H, *et al*. Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under cold stress [J]. *J Plant Biol*, 2014, 57(6): 337-348.

[13] Panche A N, Diwan A D, Chandra S R. Flavonoids: An overview [J]. *J Nutr Sci*, 2016, 5: e47.

[14] Hurmat, Shri R, Sood P, *et al*. Exploring different environmental impacts: How abiotic factors shape flavonoid synthesis in plants [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2025, 68: 103726.

[15] 赵彤, 王姿婧, 魏秀娟, 等. 黄酮类化合物生物活性研究进展 [J]. 转化医学杂志, 2023, 12(3): 210-214.

[16] Lu Y F, Zhang M L, Meng X N, *et al*. Photoperiod and shading regulate coloration and anthocyanin accumulation in the leaves of *Malus* crabapples [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2015, 121(3): 619-632.

[17] Zhang K M, Wang J W, Guo M L, *et al*. Short-day signals are crucial for the induction of anthocyanin biosynthesis in *Begonia semperflorens* under low temperature condition [J]. *J Plant Physiol*, 2016, 204: 1-7.

[18] 谷传凯, 褚璇, 刘洪利, 等. 基于高光谱技术的金线莲多糖与黄酮含量的无损检测 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(7): 227-234.

[19] Daryanavard H, Postiglione A E, Mühlemann J K, *et al*. Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2023, 72: 102350.

[20] Lingwan M, Pradhan A A, Kushwaha A K, *et al*. Photoprotective role of plant secondary metabolites: Biosynthesis, photoregulation, and prospects of metabolic engineering for enhanced protection under excessive light [J]. *Environ Exp Bot*, 2023, 209: 105300.

[21] Zhang Q F, Ruan J Y, Mumm R, *et al*. Dynamic changes in the antioxidative defense system in the tea plant reveal the photoprotection-mediated temporal accumulation of flavonoids under full sunlight exposure [J]. *Plant Cell Physiol*, 2022, 63(11): 1695-1708.

[22] Hu Y Y, Guan X T, He Z L, *et al*. Apigenin-7-*O*-glucoside alleviates DSS-induced colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. *J Funct Foods*, 2023, 104: 105499.

[23] Saquib Q, Ahmed S, Ahmad M S, *et al*. Anticancer efficacies of persicogenin and homoeriodictyol isolated from *Rhus retinorrhoea* [J]. *Process Biochem*, 2020, 95: 186-196.

[24] Bisht D, Rashid M, Arya R K K, *et al*. Revisiting liquorice

(*Glycyrrhiza glabra* L.) as anti-inflammatory, antivirals and immunomodulators: Potential pharmacological applications with mechanistic insight [J]. *Phytomed Plus*, 2022, 2(1): 100206.

[25] Dzoyem J P, Nkuete A H L, Ngameni B, *et al*. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(10): 1129-1134.

[26] Thilavech T, Adisakwattana S. Cyanidin-3-rutinoside acts as a natural inhibitor of intestinal lipid digestion and absorption [J]. *BMC Complementary Altern Med*, 2019, 19(1): 242.

[27] Liu C D, Yang N, Chen X K, *et al*. The flavonoid 7, 4′-dihydroxyflavone prevents dexamethasone paradoxical adverse effect on eotaxin production by human fibroblasts [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(3): 449-458.

[28] Yue Z Y, He S H, Wang J P, *et al*. Glyceollins from soybean: Their pharmacological effects and biosynthetic pathways [J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21874.

[29] Kurkiewicz M, Możdzierz A, Rzepecka-Stojko A, *et al*. Chrysin: A comprehensive review of its pharmacological properties and therapeutic potential [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(8): 1162.

[30] Cho Y C, Park J, Cho S. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of luteolin-7-*O*-glucuronide in LPS-stimulated murine macrophages through TAK1 inhibition and Nrf2 activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2007.

[31] Cao Y L, Mei Y Y, Zhang R N, *et al*. Transcriptional regulation of flavonol biosynthesis in plants [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(4): uhae043.

[32] Ren C H, Qian J F, Wang Y C, *et al*. Flavonoid UDP-glycosyltransferase in plants: Functional identification, substrate recognition mechanism, and biotechnology application [J]. *Phytochem Rev*, 2025, 24(5): 4451-4474.

[33] Manzoor M A, Ali Sabir I, Shah I H, *et al*. Flavonoids: A review on biosynthesis and transportation mechanism in plants [J]. *Funct Integr Genomics*, 2023, 23(3): 212.

[34] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 176-185.

[35] 郑浩杰, 杭烨, 王晓红, 等. 药用植物 WRKY 转录因子家族研究进展 [J]. 植物生理学报, 2022, 58(6): 1055-1067.

[36] Pérez-Llorca M, Müller M. Unlocking nature's rhythms: Insights into secondary metabolite modulation by the circadian clock [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 7308.

[责任编辑 时圣明]