

转录组学联合代谢组学分析挖掘佛手黄酮类物质生物合成途径关键基因

潘媛^{1,3}, 谭均^{1,3}, 陈大霞^{1,2,3*}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065
2. 重庆中医药学院, 重庆 402760
3. 中国中医科学院中药资源中心 重庆分中心, 重庆 400065

摘要: **目的** 基于转录组和代谢组联合挖掘佛手 *Citrus medica* 中关键黄酮类物质生物合成关键基因, 为进一步探究佛手中黄酮类物质的合成调控机制提供基础。**方法** 采用 Illumina HiSeqTM 4 000 高通量测序平台对佛手不同发育时期的果实组织进行转录组测序, 借助 LC-MS/MS 技术, 对其黄酮类物质进行表征, 通过 KEGG 数据库和关联分析, 充分挖掘佛手黄酮类物质生物合成关键基因。**结果** 通过代谢组学和转录组学分析共获得 21 个差异黄酮类物质和 25 个差异表达基因, 均存在明显差异。佛手黄酮类物质生物合成途径中, 香橙素-7-*O*-葡萄糖苷、圣草次苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、橙皮素-3-*O*-葡萄糖苷等随果实的发育逐渐降低, 芹菜素-5-*O*-葡萄糖苷、木犀草素-4-*O*-葡萄糖苷等物质随果实的发育逐渐升高; 在佛手黄酮类物质代谢途径中, 成功鉴定到苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase, *PAL*)、4-香豆酸辅酶 a 连接酶 (4-comarate coenzyme a ligase, *4CL*)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase, *CHS*)、查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, *CHI*)、黄酮 3-羟化酶 (flavonol-3-dehydrogenase, *F3H*)、黄酮 3'-羟化酶 (flavonol-3'-dehydrogenase, *F3'H*)、黄酮合酶 (flavone synthase, *FNS*)、花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, *ANS*)、糖基转移酶 (UDP-glycotransferases, *UGTs*) 等关键酶基因。关键酶基因 *PAL*、*4CL*、*CHS*、*F3H*、*FNS* 等负向调控下游代谢物, *CHI*、*UGTs* 等正向调控下游代谢物, 均与下游代谢物显著相关。**结论** 揭示了佛手在不同发育阶段黄酮类代谢物和相关基因的差异表达模式, 为阐明佛手黄酮类物质生物合成调控机制奠定理论基础。

关键词: 佛手; 转录组; 代谢组; 黄酮类; 关键基因; 香橙素-7-*O*-葡萄糖苷; 圣草次苷; 柚皮苷; 芸香柚皮苷; 橙皮素-3-*O*-葡萄糖苷; 芹菜素-5-*O*-葡萄糖苷; 木犀草素-4-*O*-葡萄糖苷

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5179-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.021

Transcriptomic and metabolomic integrated analysis for mining key genes in biosynthesis pathway of flavonoids from *Citrus medica*

PAN Yuan^{1,3}, TAN Jun^{1,3}, CHEN Daxia^{1,2,3}

1. Chongqing Institute of Chinese Material Medica, Chongqing 400065, China
2. Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760, China
3. Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective The explore key genes involved in the biosynthesis of key flavonoids in *Citrus medica* through integrated transcriptomic and metabolomic analysis, and to provide a basis for further investigating the regulatory mechanism of flavonoid biosynthesis in fingered citron. **Methods** The transcriptome was sequenced by Illumina HiSeqTM 4 000 high-throughput sequencing platform for the fruit tissues at different developmental stages, and the flavonoids were characterized by LC-MS/MS technology. The key genes for biosynthesis of flavonoids were fully explored through KEGG database and association analysis. **Results** A total of 21 differentially expressed flavonoids and 25 differentially expressed genes were obtained by metabolomics and transcriptomic analysis, and there were significant differences in metabolites and key genes in the three periods. In the biosynthesis pathway of the flavonoids, the contents of naringenin-7-*O*-glucoside, eriocitrin, naringin, meringin, hesperidin-3-*O*-glucoside gradually decreased with the development of fruit, while the contents of apigenin-5-*O*-glucoside and luteinin-4-*O*-glucoside gradually increased with the

收稿日期: 2025-02-03

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展重点项目 (cstc2021jsex-gksbX0015)

作者简介: 潘媛, 研究员, 主要从事中药材品种选育和生物技术研究。Tel: (023)89029062 E-mail: pypanpanpy@163.com

*通信作者: 陈大霞, 研究员, 主要从事药用植物栽培与品种选育研究。Tel: (023)89029062 E-mail: 17837@163.com

development of fruit. Key enzyme genes such as phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), 4-coumarate coenzyme A ligase (*4CL*), chalcone synthase (*CHS*), chalcone isomerase (*CHI*), flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*), flavone synthase (*FNS*), anthocyanidin synthase (*ANS*), and UDP-glycosyltransferases (*UGTs*) were successfully identified in the metabolic pathway of the flavonoids. *PAL*, *4CL*, *CHS*, *F3H*, *FNS* negatively regulate downstream metabolites, which *CHI* and *UGTs* positively regulate downstream metabolites, all of which are significantly correlated with downstream metabolites. **Conclusion** The differential expression patterns of flavonoid metabolites and related genes in different developmental stages were revealed, which laid a theoretical foundation for elucidating the regulation mechanism of flavonoid biosynthesis in *Citrus medica* 'Fingered'.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarco-dactylis* Swingle; transcriptome; metabolome; flavonoid; key genes; eriocitrin; naringin; narirutin; hesperetin-3'-*O*-glucoside; apigenin-5-*O*-glucoside; luteolin-4-*O*-glucoside

佛手为芸香科香橼属植物佛手 *Citrus medica* L. var. *sarco-dactylis* Swingle 的干燥果实^[1], 主治脘腹胀痛、脾胃气滞、食欲不振、咳嗽痰多等症, 具有疏肝、解郁、理气、和胃止痛、燥湿化痰、平喘的药用疗效^[2]。研究表明其主要化学成分有黄酮类、香豆素类、挥发油、氨基酸和微量元素等^[3], 其中黄酮类代谢物是评价佛手质量的关键次生代谢物^[4], 该类成分除具有显著的药理活性外, 还可以促进植物生长^[5], 抵抗疾病^[6]、抵抗紫外线辐射的伤害^[7]、清除氧自由基^[8]、显著改善植物对病虫害的抗性且能有效平衡植物体与外界环境的交互关系^[9, 11-12]。黄酮类物质在佛手果实色泽形成、药效成分合成、风味构建以及改善其抗逆性方面具有重要的影响^[10]。

黄酮类物质一般在细胞质中合成, 然后转运到液泡中累积^[11]。黄酮类物质的生物合成途径骨架已较清晰, 其生物合成来自苯丙烷代谢途径^[13], 经途径中的多种酶催化合成各类黄酮。近年来在中药黄酮类物质生物合成结构基因的筛选、克隆及功能验证等的研究报道较多, 陆续从红花、黄花蒿、银杏、蒙古黄芪、杭白菊、余甘子等药用植物中克隆出包括查耳酮合成酶 (*chalcone synthase*, *CHS*)、查耳酮异构酶 (*chalcone isomerase*, *CHI*)、黄酮 3-羟化酶 (*flavonol-3-dehydrogenase*, *F3H*)、黄酮 3'-羟化酶 (*flavonol-3'-dehydrogenase*, *F3'H*)、类黄酮-3',5'-羟化酶基因 (*flavonoid-3',5'-hydroxylase gene*, *F3'5'H*)、二氢黄酮醇 4 还原酶 (*dihydroflavonol 4-reductase*, *DFR*) 等多个结构基因^[14-19]。随着研究的不断深入, 从转录因子、植物激素和环境因素等方面, 对药用植物黄酮类成分生物合成的分子调控上也取得了较大的进展。其中包括黄花蒿中的 *AaYABBY5*^[20]、银杏中的 *GbMYBF2*^[21]、菊花中的 *CmMYB4* 和 *CmMYB5*^[22]等, 在调控黄酮类物质的生物合成中有重要作用。

目前, 代谢组学和转录组学联合分析已被广泛应用于研究次级代谢物累积响应机制, 为挖掘候选关键

基因的有效技术方法。目前, 佛手次生代谢产物的研究主要集中在化合物的提取和分离、药理药效等方面, 而在分子水平上基于转录组和代谢组综合分析鉴定佛手次生代谢产物生物合成相关基因及相关机制解析则相对较少。因此, 本研究结合转录组学与代谢组学技术鉴定不同发育时期佛手果实中的黄酮类代谢物及其生物合成途径中的相关基因, 并对差异代谢物与基因进行分析, 初步筛选与黄酮类代谢产物生物合成密切相关的结构基因和转录因子, 以探明佛手发育过程中黄酮类代谢产物生物合成的分子调控机制, 为更好地利用其药用价值提供数据基础。

1 材料

川佛手样品于 2023 年 8~10 月采自重庆市大足区川佛手种植基地, 选取长势良好的健康果实, 根据川佛手果实的不同发育时期, 分别采集五年生绿果 (green fruit, G)、黄绿果 (yellow green fruit, YG) 和黄果 (yellow fruit, Y) 各 3 份 (每 2 株混合成 1 份) (图 1), 分组为 G1~G3、YG1~YG3 和 Y1~Y3, 用去离子水清洗, 切成 1 cm×1 cm×1 cm 的小块, 用锡纸包好后经液氮速冻并保存于实验室超低温冰箱中, 用于转录组和代谢组分析。所有样品经重庆市中药研究院陈大霞研究员鉴定, 为芸香科柑橘属植物佛手 *C. medica* L. var. *sarco-dactylis* Swingle 的果实。



G-绿果; YG-黄绿果; Y-黄果。
G-green fruit; YG-yellow green fruit; Y-yellow fruit.

图 1 不同发育时期佛手样本

Fig. 1 *Citrus medica* samples at different developmental stages

2 方法

2.1 佛手代谢物的提取和鉴定

2.1.1 佛手代谢物的提取 试验样品真空冷冻干燥后,利用研磨仪(MM 400, Retsch 公司)研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉末状;称取 100 mg 的粉末,溶解于 1.0 mL 提取液(70%甲醇水溶液)中于 4 °C 冰箱过夜;离心后用微孔滤膜(0.22 μm)过滤样品,并保存于进样瓶中,用于 LC-MS/MS 分析。

2.1.2 色谱和质谱条件 色谱条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为 0.04%的乙酸(A)-乙腈(B);洗脱梯度:0~11.0 min, 95%~5%A; 11.0~12.0 min, 5%A; 12.0~15.0 min, 5%~95%A;体积流量 0.4 mL/min;柱温 40 °C;进样量 5 μL。质谱条件:质谱电喷雾离子源温度为 550 °C,电子喷雾电压 5 500 V(正离子模式)/-4 500 V(负离子模式),离子源气体 I, 气体 II 和气帘气分别设置为 50、60 和 25 psi (1 psi=6.89 kPa),碰撞诱导电离参数设置为高。QQQ 扫描使用多反应监测(MRM)模式,并将碰撞气体(氮气)设置为中等。根据每个时期内洗脱的代谢物,在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对^[23]。

2.1.3 代谢物数据分析 使用 Analyst 1.6.1 软件(AB SCIEX, Ontario, 加拿大),利用主成分分析(principal component analysis, PCA)了解各组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异度大小。差异代谢物的筛选指标为:VIP ≥ 1、fold change (FC) ≥ 2 或 FC ≤ 0.5。

2.2 RNA 提取与测序

采用 Trizol 法提取各样品总 RNA,并将提取的 RNA 进行等量混合,使用分光光度计检测 RNA 质量,以保证符合建库质量要求。总 RNA 检测合格后,将带有 Oligo (dT) 的磁珠对 mRNA 分离富集,使 mRNA 片段化,分为 100~400 bp 的短片段,以 mRNA 片段为模板,用逆转录试剂盒和随机引物合成第一链 cDNA,再合成并纯化双链 DNA。纯化的 DNA 需进行末端修复及加 A 尾,利用 AMPure XP beads 试剂盒选择片段大小,然后进行 PCR 扩增并纯化 PCR 产物,制备 cDNA 文库,并利用 Illumina HiSeqTM 4000 高通量测序平台进行转录组测序。

2.3 RNA-Seq 数据的分析与注释

将测序获得原始读序(raw data)进行数据质量控制,去除里面低质量的序列,从而获得干净序列(clean data)。本研究采用 Trinity 软件对 clean data

进行拼接,并通过序列之间的重叠信息组装得到重叠群,之后组装得到转录本。本研究利用非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein database, Nr)、高质量非冗余蛋白序列数据库(Swiss-Prot protein sequence database, Swiss-Prot)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和真核生物蛋白相邻类的聚簇(clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes, KOG)等数据库进行相似性比对、GO 分类和注释、KEGG 代谢通路分析,进而获得所有 Unigenes 的功能注释信息。

2.4 结构基因与转录因子分析

使用 Hmmbuild 为佛手黄酮类合成途径构建隐马尔可夫模型(HMM),整合相关结构基因(如 PAL、4CL、FDR、ANS)和转录因子(如 MYB、bHLH、NAC)。随后,通过 Hmsearch 鉴定同源基因^[24],选择差异表达基因(DEGs)用于分析结构基因和转录因子。在差异代谢物(DAFs)和 DEGs 的数据集之间进行 Spearman 相关分析。如果 Spearman 相关系数(r) > 0.9, P 值显著 < 0.05, 则表明 DAFs 和 DEGs 之间存在差异表达的强相关性。

2.5 定量实时 PCR 及表达验证

使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒提取各样品总 RNA,使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒合成 cDNA, qRT-PCR 使用 SYBR Premix Ex TaqTMII 试剂盒,以佛手 actin 基因为内参基因(表 1)。qRT-PCR 反应体系组成:SYBR Premix Ex TaqTM II 5 μL, 正、反向引物各 0.4 μL,加水至 10 μL。反应程序:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 40 个循环。PCR 扩增反应在 CF×96TM Real Time PCR Detection System (Applied Biosystems, Forter City, CA, 美国)仪器上进行,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量。为确保实验的可靠性,对样品进行 3 个生物重复和 3 次技术重复。引物序列如表 1 所示。

3 结果与分析

3.1 佛手代谢物鉴定

由于佛手在生长发育过程中果实表型差异明显,且目前在食用和药用领域基本上都以成熟时期的佛手黄果为材料,同时黄酮类代谢物具备重要药理活性,并且在果实色泽形成上起重要作用,因此

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')
<i>CmPAL</i>	F: TGACCCTTTGAACTGGACCG R: TGGCCAATGGTCAAGGACTC
<i>Cm4CL</i>	F: TCTCGGGCAGGGATATGGAA R: TTGTGCTCTTTGTCGCCTCT
<i>CmCHS</i>	F: CACCATCACCGAACAAAGCC R: TCCTTGCTATGGACTGCACC
<i>CmCHI</i>	F: CAGCCACCCGTTTATTCTCA R: AGAAGAGGCAATTCAGCGCA
<i>CmFNS</i>	F: GCCGCCATTGAATGCCTTAC R: GAGCTCAACTGCGGACATCT
<i>CmDFR</i>	F: GCTCTGTTTCGCTCCTCACTT R: AACGATTCATGACGCAGCAC
<i>CmANS</i>	F: GTGGCGCGAGTTCTTCAATC R: CTGCCGTAGCCTTCGTATGT
<i>CmUGT</i>	F: GGGGTTTGGAGCAAAGCAAG R: CCCTTCCGGCAAGTAATGGT
<i>Cmactin</i>	F: AAATGGTGTGTTGATCAAGGGA R: ATTCCGCATCAGAGATCAAC

认为黄酮类代谢物在佛手果实生长发育过程中的色泽形成和药效成分累积中起重要作用。本研究从黄酮类物质入手,借助超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS),利用软件Analyst 1.6.3处理质谱数据,基于数据库MWDB(metware database,迈维代谢)和网络数据库比对,最终检测到1607种代谢物,其中包括368种黄酮类化合物及其衍生物(170种黄酮、117种黄酮醇、34种二氢黄酮、15种查耳酮、9种异黄酮、7种黄烷醇、6种其他黄酮类、5种花青素、4种二氢黄酮醇、1种二氢异黄酮),见表2。在鉴定的上述黄酮类物质中,黄酮数量最多,占鉴定总黄酮类物质的46.20%,其次是黄酮醇,占31.79%,二氢异黄酮的数目最少,仅占0.27%。

表2 佛手黄酮类代谢物鉴定

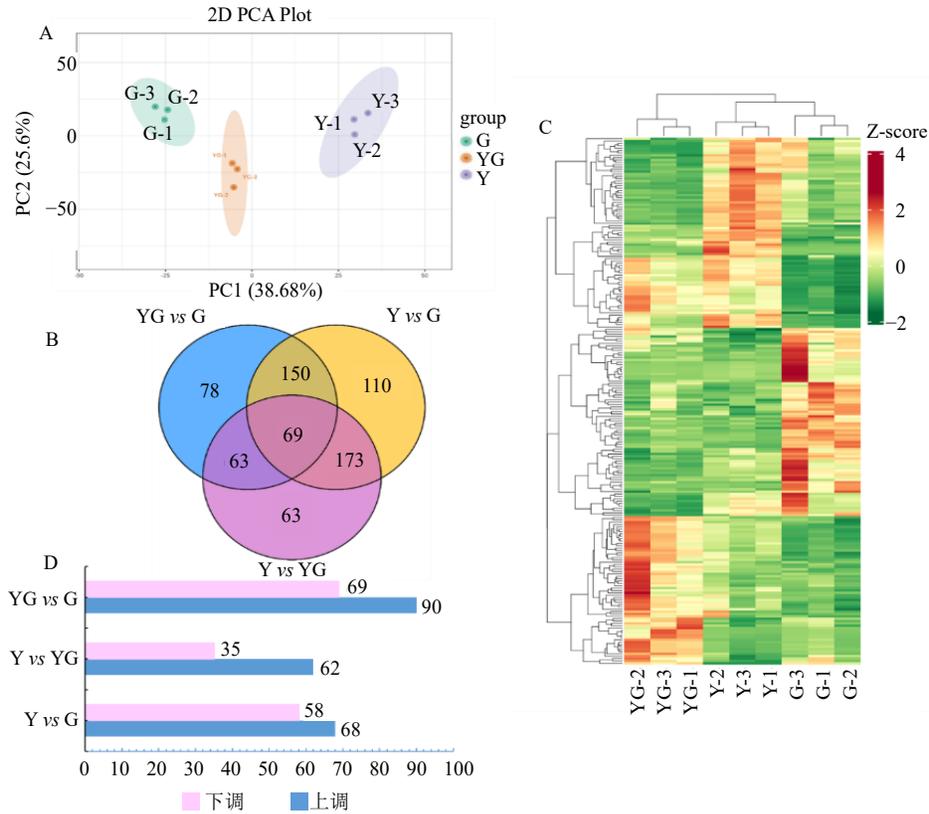
Table 2 Identification of flavonoid metabolites of bergamot

分类	数目	占比/%
查耳酮	15	4.08
二氢黄酮	34	9.24
二氢黄酮醇	4	1.09
二氢异黄酮	1	0.27
花青素	5	1.36
黄酮	170	46.20
黄酮醇	117	31.79
黄烷醇类	7	1.90
其他黄酮类	6	1.63
异黄酮	9	2.45
总计	368	100.00

3.2 佛手代谢物差异分析

通过对佛手代谢组数据进行PCA分析,结果如图2-A所示,图中每个点分别代表1个样本,样本的重复性高,各样本组间分离明显,说明不同发育时期的佛手样本存在明显的变化与差别,可以进行进一步分析。为了分析不同发育时期佛手样本中黄酮类代谢物的变化规律,通过数据归一化处理及聚类分析,可见佛手不同发育时期样本组内重复性较好,代谢物变化趋势基本一致,组间存在明显的差异(图2-C)。韦恩图(Venn)通常用于表示有限的不同集合之间的所有可能的逻辑关系,对不同佛手样本代谢物进行两两比较(图2-B),3个发育时期的共有差异代谢物有69种,其中有黄酮类代谢物13种,包括圣草酚-6,8-C-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-芸香糖苷、香橙素-7-O-葡萄糖苷、2,4-二羟基-2,3,6-三甲氧基查耳酮、3-羟基葛根素、木犀草素-6-C-葡萄糖苷等。为了鉴定与药效成分累积和果实颜色变化有关的化合物,以绿果(G)为参照组,黄绿果(YG)和黄果(Y)分别有90种和68种黄酮类物质上调,可能在影响果实颜色和药效成分累积中起着至关重要的作用(图2-D)。

结合多元统计分析OPLS-DA的VIP值和单变量统计分析 t 检验 P 值,筛选佛手不同时期的特征黄酮类差异代谢物,共鉴定到21种显著差异黄酮类代谢物,包括柚皮素查耳酮、圣草次苷、樱花素、异樱花素、橙皮素-3-O-葡萄糖苷、橙皮素-7-O-葡萄糖苷等。采用佛手青果、黄绿果和黄果的差异黄酮类代谢物相对含量进行聚类热图分析,3个时期的代谢物呈现明显的差异,表明不同发育时期佛手果实中有不同的黄酮类物质谱。与其他组相比,黄果中的芹菜素-8-C-(2''-葡萄糖基)阿拉伯糖苷、芹菜素-5-O-葡萄糖苷、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、木犀草素-6-C-阿拉伯糖苷-7-O-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-(2''-O-鼠李糖基)芸香糖苷等相对含量显著高于其他组,上述代谢物随着果实的发育呈逐渐升高的趋势,而肉桂酸甲酯和圣草酚-7-O-(6''-O-对香豆酰)葡萄糖苷被检测到的相对含量较低,这2种代谢物随果实的发育先升高后降低。香橙素-7-O-葡萄糖苷、圣草次苷、橙皮素-3'-O-葡萄糖苷、柚皮素-7-O-新橙皮糖苷(柚皮苷)、柚皮素-7-O-芸香糖苷(芸香柚皮苷)、橙皮素-7-O-葡萄糖苷的相对含量等在绿果中表现出显著高水平,随着果实发育相对含量逐渐降低(图3)。



A-差异代谢物的主成分分析; B-不同发育时期差异代谢物韦恩图; C-差异代谢物相对含量的热图分析; D-不同分组黄酮类代谢物的上下调特征。

A-principal component analysis of differentially accumulated metabolites; B-Venn diagram of differential metabolites at different developmental stages; C-heatmap analysis of relative contents of differential metabolites; D-up- and down-regulation characteristics of flavonoid metabolites in different groups.

图2 差异代谢物分析

Fig. 2 Differential metabolites analysis

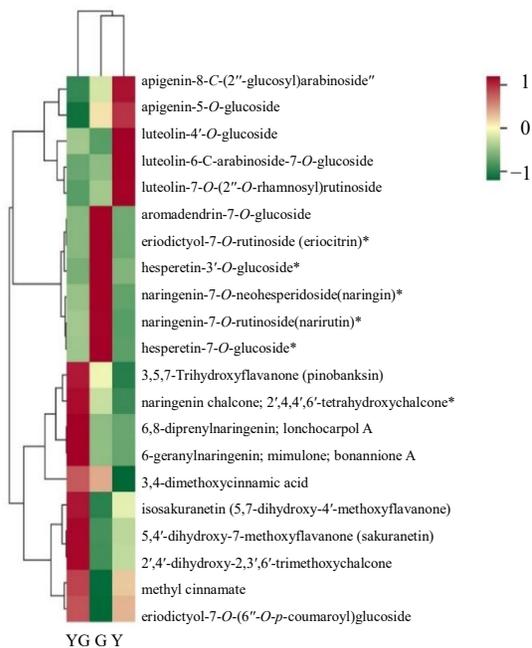


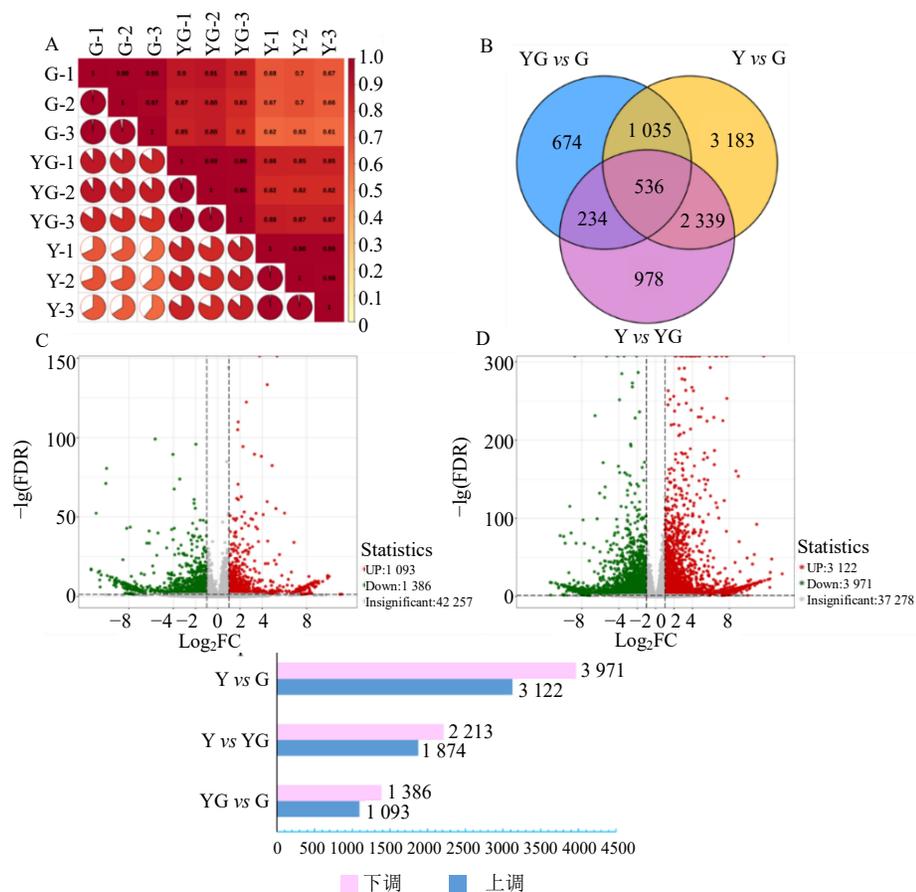
图3 黄酮类物质合成途径中差异代谢物热图
Fig. 3 Heatmap of differential metabolites in flavonoid synthesis pathway

3.3 转录组测序结果分析

为了进一步研究佛手不同发育时期黄酮类物质的合成与调控机制,本研究以3个发育时期(每个时期3个生物学重复)的果实建立了9个cDNA文库用于高通量转录组(RNA-seq)分析。通过测序获得每个样品的总计42 983 254~52 491 490个raw data。过滤低质量读数后获得clean data,占原始数据的99.97%~99.98%,每个样本的 Q_{20} 和 Q_{30} 值分别高于97.72%和93.10%。

3.4 佛手差异表达基因分析

通过与参考基因组比对分析,共获得了68 465个基因的序列和表达信息。本研究将皮尔逊相关系数(r)作为生物学重复相关性的评估指标,以评估3组样品之间的关系。3组样本的组内生物重复之间的大多数 r 超过0.9,相关性高(图4-A)。差异表达基因的火山图(图4-B、C)显示了佛手不同发育时期的差异基因分布情况,其中越接近两端的差异基因,差异程度越大。利用DESeq2软件对基因



A-样本间的相关性分析; B-各分组之间差异表达基因韦恩图; C-YG vs G 之间差异表达基因火山图; D-Y vs G 之间差异表达基因火山图; E-各分组中鉴定的差异表达基因数量。

A-correlation analysis between samples; B-Venn map of differentially expressed genes between groups; C-volcano map of differentially expressed genes between YG and G; D-volcano map of differentially expressed genes between Y and G; E- number of differentially expressed genes identified in each group.

图 4 差异表达基因分析

Fig. 4 Analysis of differentially expressed genes

表达水平分析中得到的 reads count 数据进行分析, 并基于差异分析结果, 以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 为阈值筛选的基因为显著差异基因。各比较组显著差异表达基因数量见图 4-F, 佛手不同发育时期比较组黄绿果-绿果 (YG vs G) 中表达的显著差异基因总数为 2 479 个, 其中上调表达基因 1 093 个, 下调表达基因 1 386 个; 比较组黄果-黄绿果 (Y vs YG) 中表达的显著差异基因总数为 4 087 个, 其中上调表达基因 1 874 个, 下调表达基因 2 213 个; 比较组黄果-绿果 (Y vs G) 中表达的显著差异基因总数为 7 093 个, 其中上调表达基因 3 122 个, 下调表达基因 3 971 个。此外, 使用维恩图确定 YG vs G、YG vs Y 和 Y vs G 之间的重叠差异表达基因 (图 4-B), 共发现 536 个基因在各组中均差异表达, 表明它们在影响不同发育时期佛手黄酮类物质的生物合成和调控中的潜在关键功能。

KEGG 是一个系统整合了基因组、生物学通路、疾病、药物、化学物质等信息的综合性数据库。由不同组合差异基因 KEGG 富集散点图可见, 有 5 871 个差异基因被注释在富集最显著的 23 个通路上, 其中主要富集在代谢途径 (metabolic pathways)、次生代谢产物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、苯丙烷类生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、类黄酮生物合成 (flavonoid biosynthesis)、异黄酮生物合成 (isoflavonoid biosynthesis)、黄酮和黄酮醇的生物合成 (flavone and flavonol biosynthesis) 等 (图 5), 苯丙烷类生物合成及黄酮类成分的生物合成途径都有富集不同数量的基因, 为后续筛选黄酮类成分生物合成和调控的关键基因提供数据支撑。

3.5 黄酮类物质生物合成的候选基因

为了研究黄酮类物质生物合成在绿果、黄绿果

和黄果之间的差异，本研究鉴定了黄酮类物质生物合成途径中的差异表达基因 (DEGs)。我们共鉴定了 25 个与黄酮类物质合成相关的基因，包括 *PAL*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*FNS*、*DFR* 和 *ANS*，部分 UGTs 也被鉴定出来，可能参与甲基化和黄酮类物质合成后的糖基化过程 (图 6)。随着佛手果实的发育，催化苯丙氨酸生成肉桂酸的 *PAL* 表现出显著的下调，与检测到的代谢物肉桂酸甲酯变化趋势一致；催化形成查耳酮的 *CHS1* 和 *CHS3* 与检测到的下游

代谢物查耳酮均表现出下调趋势，查耳酮的下调除了与上游催化基因有关，也可能与代谢流向不同的通路分流有关；*CHI1*、*CHI2* 和 *CHI3* 在黄果中明显上调，促进下游查耳酮的累积；在橙皮素到橙皮苷合成通路中，鉴定到 9 个表达趋势各异的糖基转移酶 (UGTs)，*UGTs4*、*UGTs6*、*UGTs9* 在黄果中表达上调，表明他们在促进黄酮类物质合成中起关键作用，但是不同的糖基转移酶的糖基转移功能还需要做进一步的研究。

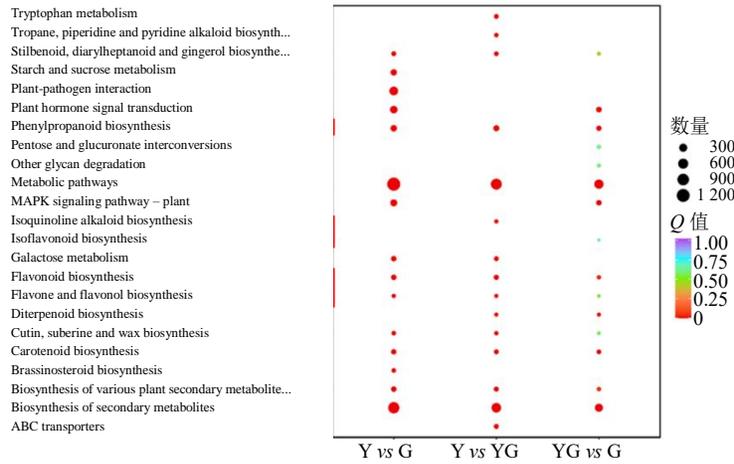
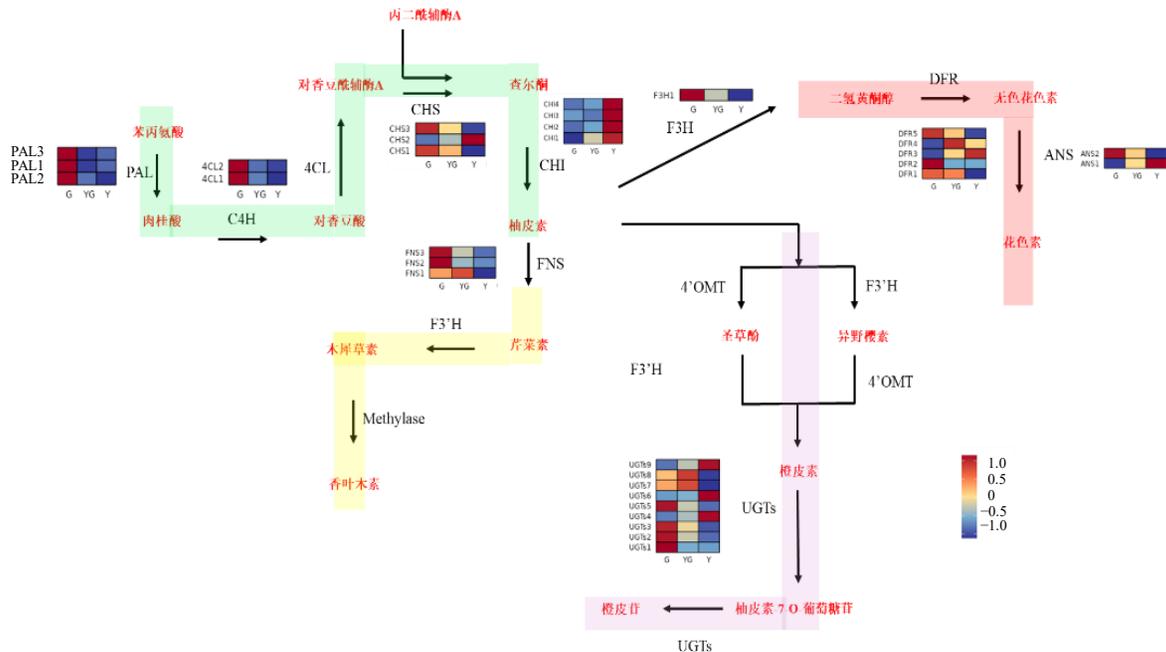


图 5 佛手不同发育时期差异基因 KEGG 富集图

Fig. 5 KEGG enrichment map of differential genes in *C. medica* at different developmental stages



彩色线条代表黄酮类物质合成的不同分支；相关差异基因在不同发育时期的表达以 FPKM 值用热图呈现；高/低表达水平分别用红色/蓝色表示。Colored lines represent the different branches of flavonoid synthesis; the expression of related differential genes in different developmental stages is presented by FPKM values using heat maps; high/low expression levels are shown in red/blue.

图 6 黄酮类物质生物合成途径中的差异表达基因调控网络

Fig. 6 Regulatory networks of differentially expressed genes in biosynthesis pathways of flavonoid

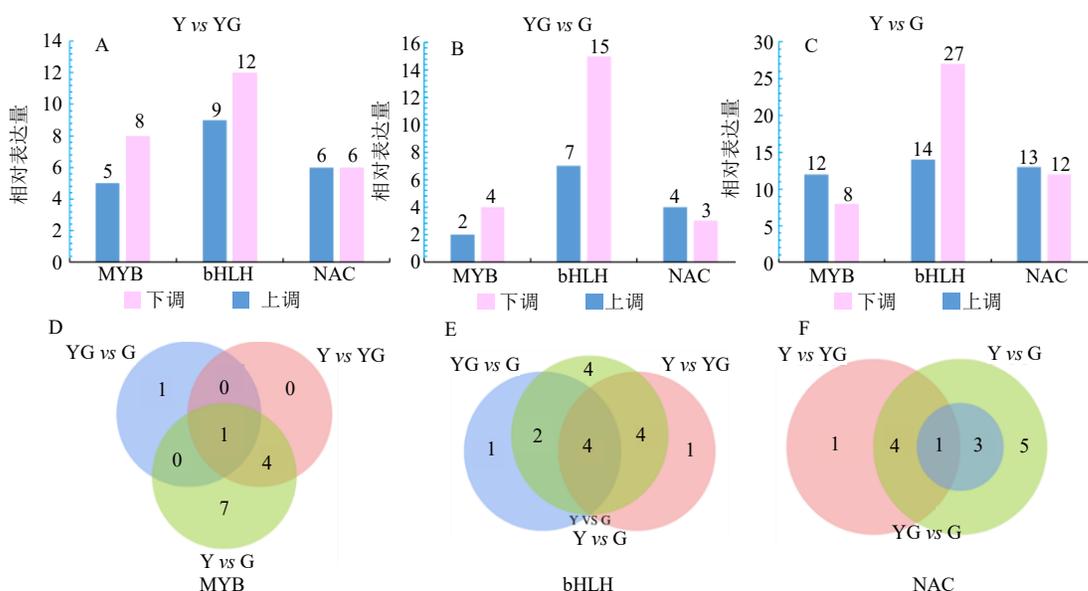
3.6 黄酮类物质生物合成相关转录因子分析

众所周知, MYB 转录因子、bHLH 转录因子和 NAC 重复蛋白在调控黄酮类物质的生物合成中起着至关重要的作用。考虑到不同发育时期佛手黄酮类代谢物存在下调和上调 2 种模式, 将转录因子基因 MYB、bHLH 和 NAC 进行了分类 (FC ≥ 2, 且 FC ≤ 0.5)。Y vs G 组有 20 个 MYBs (12 个上调, 8 个下调)、41 个 bHLHs (14 个上调, 27 个下调) 和 25 个 NACs (13 个上调, 12 个下调) 差异表达 (图 7-C)。在 YG vs G 组中, 有 6 个 MYBs (2 个上调, 4 个下调)、22 个 bHLHs (7 个上调, 15 个下调) 和 7 个 NACs (4 个上调, 3 个下调) 差异表达 (图

7-B)。Y vs YG 组有 13 个 MYBs (5 个上调, 8 个下调)、21 个 bHLHs (9 个上调, 12 个下调) 和 12 个 NACs (6 个上调, 6 个下调) 差异表达 (图 7-A)。此外, 在 YG vs G、Y vs G 和 Y vs YG 差异表达基因中, 4 个 MYBs、2 个 bHLHs 和 2 个 NACs 在不同组比较中都存在显著差异。

3.7 转录组与代谢组联合分析

为了了解黄酮类物质生物合成相关基因与差异积累黄酮类物质之间的关系, 本研究绘制了基因-代谢物相关性热图 (图 8), 大部分黄酮类物质都与其生物合成途经中的结构基因有显著相关性。综合分析结果表明, 肉桂酸甲酯 (methyl cinnamate) 的



A-Y 与 YG 中不同表达模式的转录因子; B-YG 与 G 中不同表达模式的转录因子; C-Y 与 G 中不同表达模式的转录因子; D-MYB 各组中的差异韦恩图; E-bHLHs 各组中的差异韦恩图; F-NAC 各组中的差异韦恩图。

A-Transcription factors with different expression patterns in Y and YG; B-Transcription factors with different expression patterns in YG and G; C-Transcription factors with different expression patterns in Y and G; D-Venn diagram of differences in MYB family; E-Venn diagram of differences in bHLHs family; F-Venn diagram of differences in NAC family.

图 7 转录因子 (TFs) 在不同发育时期佛手的差异表达情况

Fig. 7 Differential expression of transcription factors (TFs) in *C. medica* at different developmental stages

相对含量与 PAL1 和 UGTs1 的表达量显著负相关; 圣草次苷 (eriodictyol-7-O-rutinoside) 的相对含量与 UGTs7 的表达量显著负相关; 橙皮素-7-O-葡萄糖苷 (hesperetin-7-O-glucoside) 的相对含量与 FNS3 的表达量显著正相关; 芸香柚皮 (naringenin-7-O-rutinoside) 的相对含量与 PAL2、FNS2、FNS3、UGTs2、UGTs3、UGTs6、UGTs8、CHS1、ANS2 和 F3H1 的表达量显著正相关; 橙皮素-7-O-葡萄糖苷的相对含量与 FNS3 的表达量显著正相关; 柚皮苷 (naringenin-7-O-neohesperidoside) 的相对含

量与 PAL2、ANS2、CHS1、F3H1、UGTs1、UGTs2、UGTs3、UGTs6 和 FNS2 的表达量显著正相关, 与 CHI2 和 UGTs7 的表达量显著负相关, 上述结果为后续开展佛手黄酮类成分合成与调控研究提供数据支撑。

3.8 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, 本实验选择了 8 个与黄酮类物质生物合成相关的基因进行实时荧光定量 PCR 检测, 将这 8 个基因的相对表达量与 actin 基因的表达量归一化。结果显示,

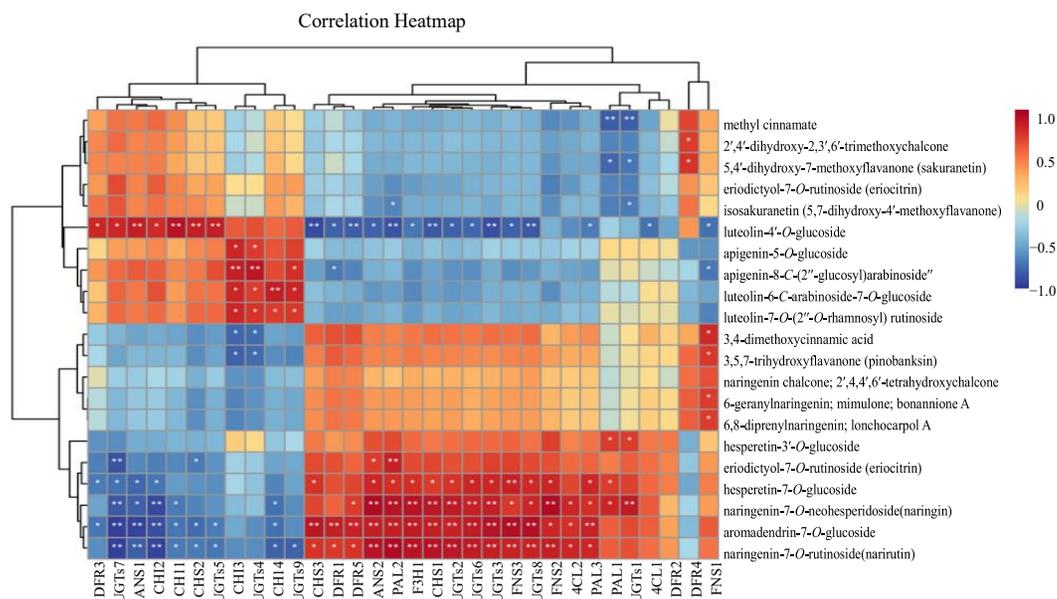


图8 黄酮类成分相对含量与结构基因的相关热图分析

Fig. 8 Correlation heatmap analysis of relative contents of flavonoids and structural genes

qRT-PCR 水平与 RNA-seq 数据中获得的基因表达模式相似 (图 9), 说明 RNA-seq 分析结果是可靠的, 将有助于进一步开展黄酮类物质的生物合成与调控研究。

4 讨论

开展药用植物药效成分的生物合成与调控研究, 对于发掘药用植物功能基因及揭示其合成的分子调控机制具有重要的理论意义, 同时也为后续开展药用植物的遗传改良及药效成分的微生物合成提供重要的基础数据^[25]。一直以来, 黄酮类物质都是药用植物中次生代谢产物研究的热点, 药用植物体内黄酮类物质结构多样, 主要源于其生物合成途径中的催化酶结构及催化活性多样, 但是随着研究的深入, 黄酮类物质的生物合成途径及途径中的重要催化酶都相对保守。大量研究表明: 芸香科植物中黄酮类物质的代谢起始于苯丙烷代谢途径, 其中苯丙氨酸作为初生代谢和次生代谢的连接点, 在 PAL、C4H 和 4CL 的作用下形成 4-香豆酰辅酶 A, 后与 CHS 的催化作用形成查耳酮, 最后查耳酮在 CHI 的作用下形成柚皮素, 从而进入各类黄酮代谢支路^[12]。黄酮类是芸香科植物果实中含量最丰富的黄酮类物质, 以糖苷的形式存在于果皮中^[26]。柚皮素连同其羟化或甲基化的产物橙皮素、圣草酚和异樱野素经过 7-O-葡萄糖苷转移酶 (7-Glct) 的作用形成 7-O-葡萄糖苷类, 然后经过 1,2-鼠李糖基转移酶 (1,2-Rhat)

的作用分别形成带苦味的柚皮苷、新橙皮苷、新圣草次苷和枳属苷; 经过 1,6-鼠李糖基转移酶 (1,6-Rhat) 的作用分别形成无苦味的柚皮芸香苷、橙皮苷、圣草次苷和香风草苷^[12, 27-28]。

本研究基于代谢组学和转录组学联合分析技术, 以不同发育时期佛手果实为研究材料, 通过代谢组学表征佛手黄酮类成分, 结合统计学方法筛选差异黄酮代谢物; 通过转录组学鉴定佛手黄酮类成分生物合成的关键基因和转录因子, 挖掘通路中关键差异表达基因; 最后通过代谢组与转录组联合分析, 构建佛手黄酮类物质的生物合成代谢通路以及基因调控网络, 解析佛手关键黄酮类物质生物合成调控机制。利用 LC-MS/MS 广泛靶向代谢组学在不同发育时期佛手样品中共鉴定到 1 607 个代谢物, 包括 368 种黄酮类化合物及其衍生物。鉴定到的黄酮类物质中香橙素-7-O-葡萄糖苷、圣草次苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、橙皮素-3-O-葡萄糖苷、芹菜素-5-O-葡萄糖苷、木犀草素-4-O-葡萄糖苷等相对含量随果实的发育逐渐下降, 芹菜素-5-O-葡萄糖苷、木犀草素-4-O-葡萄糖苷等物质随果实的发育逐渐升高。在佛手黄酮类物质代谢途径中, 成功鉴定到 PAL、4CL、CHS、CHI、F3H、F3'H、FNS、ANS、UGTs 等关键酶基因。随着佛手果实的发育, 催化苯丙氨酸生成肉桂酸的 PAL 表现出显著的下调, 与检测到的代谢物肉桂酸甲酯变化趋势一致; 催化形成查耳

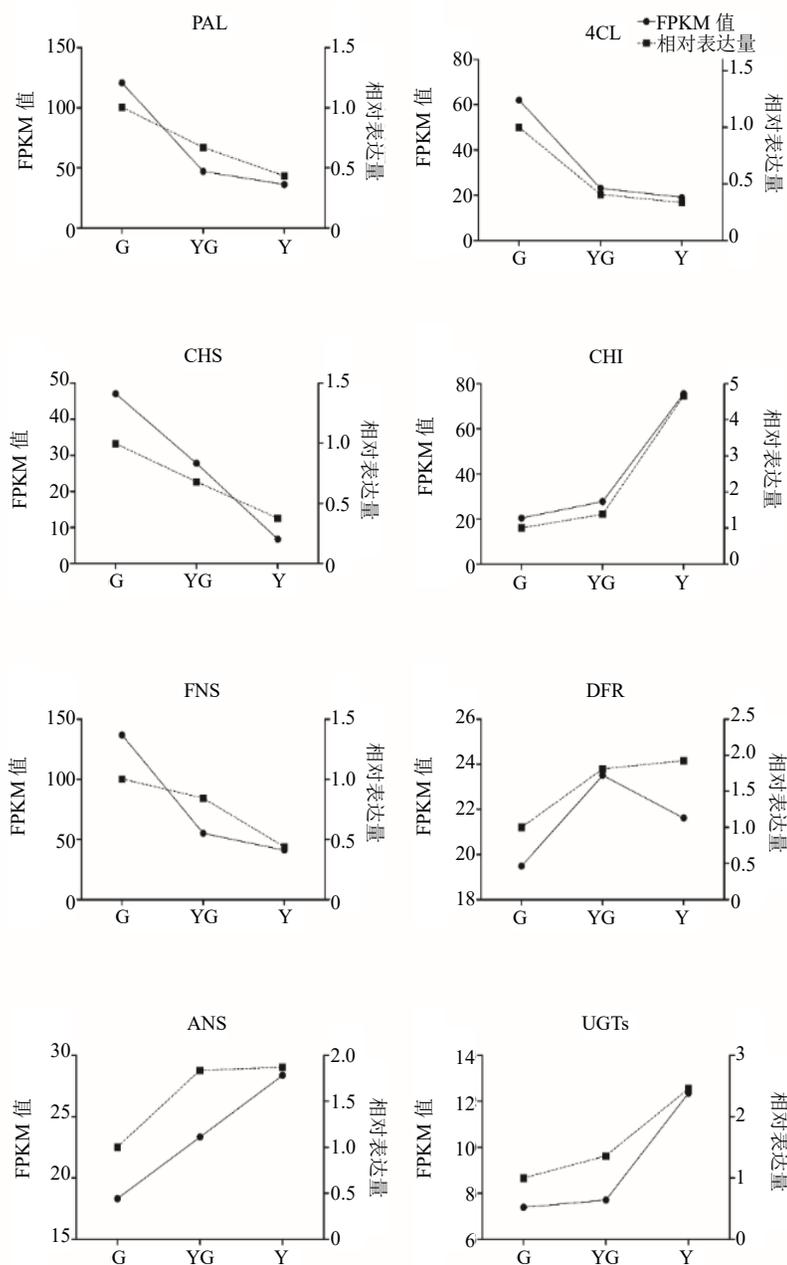


图9 转录组基因表达水平的 qRT-PCR 验证

Fig. 9 qRT-PCR validation of gene expression level in transcriptome

酮的 *CHS1* 和 *CHS3* 与检测到的下游代谢物查耳酮均表现出下调趋势，查耳酮的下调除了与上游催化基因有关，也可能与代谢流向不同的通路分流有关；*CHI1*、*CHI2* 和 *CHI3* 在黄果中明显上调，促进下游查耳酮的累积；在橙皮素到橙皮苷合成通路中，鉴定到 9 个表达趋势各异的糖基转移酶基因 (*UGTs*)，*UGTs4*、*UGTs6*、*UGTs9* 在黄果中表达上调，表明他们在促进黄酮类物质合成中起关键作用，糖基化过程较复杂，不同的糖基转移酶参与到

不同的糖基化反应中，后期的工作还将集中在糖基转移酶功能及催化机制上。生物体是一个及其复杂的有机体，每个代谢物的合成和代谢都受多个基因的调控，同时每个基因又在调控多个不同的代谢物，这就造成了实际结果中代谢物和基因的表达并不能一一对应^[29]。在佛手果实的发育过程中，次生代谢物产物在持续累积，但是随着果实发育，从绿果到黄果，从基因层面的正向调控减弱，部分代谢物的累积也逐渐降低；同时还存在代谢流的重定向，

更多的代谢流通过下游基因的调控促进其下游代谢物的累积,还需要对下游的催化酶基因及代谢产物开展进一步的研究。本研究初步构建了佛手黄酮类物质的生物合成代谢通路以及基因调控网络,挖掘到的代谢物和关键基因将为后期开展佛手黄酮类物质生物合成和品质调控提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 185.
- [2] 赵永艳, 胡瀚文, 彭腾, 等. 佛手的化学成分药理作用及开发应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(11): 2734-2736.
- [3] 简少芬, 龚舒, 马延红, 等. 佛手黄酮成分结构、提取工艺及生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(6): 198-204.
- [4] 刘心语. 佛手质量标志物的研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [5] Stafford H A. Flavonoid evolution: An enzymic approach [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96(3): 680-685.
- [6] Agati G, Azzarello E, Pollastri S, et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance [J]. *Plant Sci*, 2012, 196: 67-76.
- [7] Harborne J B, Williams C A. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [8] Agati G, Stefano G, Biricolli S, et al. Mesophyll distribution of 'antioxidant' flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance [J]. *Ann Bot*, 2009, 104(5): 853-861.
- [9] Falcone Ferreyra M L, Rius S P, Casati P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications [J]. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 222.
- [10] 陈纪言. 多组学解析广佛手果实内黄酮类代谢物时空分布特点 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2023.
- [11] 黄菊, 张玮扬, 邹灿, 等. 甘草黄酮类成分抗肿瘤研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1456-1466.
- [12] 陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 等. 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展 [J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 384-400.
- [13] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493.
- [14] 陈超, 任超翔, 鲜彬, 等. 中药黄酮类成分生物合成分子调控研究进展 [J]. 中药材, 2023, 46(12): 3163-3170.
- [15] Guo D D, Xue Y R, Li D Q, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1409.
- [16] Dilshad E, Zafar S, Ismail H, et al. Effect of rol genes on polyphenols biosynthesis in *Artemisia annua* and their effect on antioxidant and cytotoxic potential of the plant [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 179(8): 1456-1468.
- [17] Cheng H, Li L L, Cheng S Y, et al. Molecular cloning and function assay of a Chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 49-62.
- [18] 邹庆军, 汪涛, 郭巧生, 等. 杭菊黄酮醇合酶基因的原核表达与重组蛋白体外活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3471-3476.
- [19] 李永宁, 王双宜, 赵琦, 等. 基于转录组挖掘野生和栽培余甘子类黄酮生物合成关键基因 [J]. 成都中医药大学学报, 2025, 48(1): 28-35.
- [20] Kayani S I, Shen Q, Rahman S U, et al. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in *Artemisia annua* by *AaYABBY5* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 257.
- [21] Jia Z, Zhao B, Liu S, et al. Embryo transcriptome and miRNA analyses reveal the regulatory network of seed dormancy in *Ginkgo biloba* [J]. *Tree Physiol*, 2020, 41(4): 1247-1263.
- [22] 李梦灵. *CmMYBs* 转录因子调控菊花花青素苷依光合成的分子机制 [D]. 北京: 北京林业大学, 2022.
- [23] Chen W, Gong L, Guo Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1769-1780.
- [24] Rabiner L R. A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition [J]. *IEEE*, 1989, 77(2): 257-286.
- [25] 王乙淋, 李宏宇, 韦共宇, 等. 基于转录组和代谢组分析八角黄酮类化合物合成途径关键基因 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52(12): 60-68.
- [26] Cheigh C I, Chung E Y, Chung M S. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water [J]. *J Food Eng*, 2012, 110(3): 472-477.
- [27] Khan M K, Zill-E-Huma, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major *Citrus* polyphenols [J]. *J Food Compos Anal*, 2014, 33(1): 85-104.
- [28] Li S J, Wang Z, Ding F, et al. Content changes of bitter compounds in 'Guoqing No.1' *Satsuma* mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) during fruit development of consecutive 3 seasons [J]. *Food Chem*, 2014, 145: 963-969.
- [29] 潘媛, 赵晓, 陈大霞. 灰毡毛忍冬花不同发育阶段的转录组学与代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2798-2805.

[责任编辑 时圣明]