

转录组和代谢组联合分析不同生长时期覆盆子黄酮类物质生物合成途径关键基因

安雪莉¹, 钱 灿¹, 侯卓妮^{1,2*}, 杨东风^{1,2*}

1. 浙江理工大学生命与医药学院, 浙江 杭州 310018

2. 浙江理工大学 绍兴生物医药研究院有限公司, 药食同源保健食品开发技术浙江省工程研究中心, 浙江 绍兴 312366

摘要: **目的** 探究不同生长时期覆盆子 *Rubus chingii* 果实中的黄酮类物质的变化规律, 解析其苷类物质积累分子机制。**方法** 利用 UPLC-MS/MS 靶向代谢组学技术和高通量转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 分析了覆盆子果实 5 个不同生长时期 S1(小青果)、S2(大青果)、S3(绿转黄果)、S4(黄转红果)、S5(红果)黄酮类化合物积累的变化, 利用 MetaboAnalyst 结合 KEGG、MWDB 等数据库进行代谢物的功能注释, 并利用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选差异代谢物, 并将 2 组学进行联合分析。**结果** 利用 UPLC-MS/MS 从 5 个不同时期覆盆子果实共鉴定出 87 种代谢物, 其中分别检测出 81 (S1)、77 (S2)、78 (S3)、76 (S4)、77 (S5) 种差异积累代谢物, 差异代谢物主要富集在黄酮生物合成、异黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、次级代谢物的生物合成等途径。利用高通量测序对 5 个不同时期覆盆子果实进行转录组文库构建, 共获得 114.7 Gb 的 Clean Data, 每个样品均达到 6.23 M clean reads 以上, 各样本 Q_{30} 碱基占 92.3% 及以上。将不同生长时期的转录组进行对比, 差异基因表达分别为有 2 354 个 (S1 vs S2)、1 027 个 (S1 vs S3)、3 370 个 (S1 vs S4)、10 249 个 (S1 vs S5)。**结论** 从代谢和转录的 2 个层面对覆盆子不同生长时期中的黄酮代谢物变化和转录变化展开分析, 共注释到了黄酮合成途径的 15 个黄酮代谢物和 95 个基因, 将其进行相关性分析发现, 查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, *CHI*)、对羟基肉桂酰转移酶 (hydroxycinnamoyl transferase, *HCT*)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, *CHS*)、黄酮醇合酶 (flavonol synthase, *FLS*)、黄烷醇-3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, *F3H*)、黄酮 3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, *F3'H*) 等基因的表达水平与黄酮代谢物的积累显著相关, 表明这些基因参与调控黄酮类化合物的生物合成。首次阐述了覆盆子的黄酮类成分的合成途径和相关基因, 为利用生物工程技术生产其黄酮类化合物提供了依据, 对于扩大药用资源具有重要意义。

关键词: 覆盆子; 代谢组学; 转录组学; 差异代谢物; 黄酮类化合物; 联合分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7928-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.022

Integrated analysis of transcriptome and metabolome reveals key genes involved in flavonoid biosynthesis pathways in *Rubus chingii* at different growth stages

AN Xueli¹, QIAN Can¹, HOU Zhuoni^{1,2}, YANG Dongfeng^{1,2}

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

2. Zhejiang Sci-Tech University Shaoxing Bio-pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Zhejiang Engineering Research Center for Development Technology of Food and Medicine Homologous Health Food, Shaoxing 312366, China

Abstract: Objective To investigate the variation patterns of flavonoid compounds in *Rubus chingii* at different developmental stages and to elucidate the molecular mechanisms underlying the accumulation of glycosides. **Methods** Targeted metabolomics based on UPLC-MS/MS and high-throughput transcriptome sequencing (RNA sequencing, RNA-seq) were used to analyze the changes in flavonoid compound accumulation during five developmental stages of *R. chingii*: S1 (little green fruit), S2 (large green fruit), S3 (green-to-yellow fruit), S4 (yellow-to-red fruit), S5 (red fruit). Functional annotation of metabolites was performed using MetaboAnalyst in conjunction with KEGG, MWDB, and other databases. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to screen differential metabolites. An integrated analysis of metabolomics and transcriptomics was conducted. **Results** A total of 87 metabolites were identified across

收稿日期: 2025-05-05

基金项目: 浙江省公益基金计划项目 (LTGN24H280001); 浙江省自然科学基金重大项目 (LD25H280001)

作者简介: 安雪莉, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物有效成分的鉴定及生物合成途径分析。E-mail: 2269233842@qq.com

*通信作者: 侯卓妮, 副教授, 从事天然产物有效成分分离纯化、结构鉴定及生物合成途径方面研究。E-mail: houzhuoni@zstu.edu.cn

杨东风, 教授, 从事天然活性成分生物合成调控、天然药物与药食同源产品开发。E-mail: ydf807@sina.com

the five developmental stages using targeted metabolomics. Differentially accumulated metabolites were detected in the following numbers: 81 (S1), 77 (S2), 78 (S3), 76 (S4), and 77 (S5). These metabolites were mainly enriched in pathways including flavonoid biosynthesis, isoflavonoid biosynthesis, flavone and flavonol biosynthesis, and secondary metabolite biosynthesis. High-throughput sequencing generated a total of 114.7 Gb of clean data, with each sample producing over 6.23 M Clean reads and Q_{30} base percentages above 92.3%. Comparative transcriptome analysis across developmental stages revealed differentially expressed genes: 2 354 (S1 vs S2), 1 027 (S1 vs S3), 3 370 (S1 vs S4), and 10 249 (S1 vs S5);

Conclusion This study analyzed the changes in flavonoid metabolites and transcriptome profiles of *R. chingii* at different developmental stages from both metabolic and transcriptional perspectives. A total of 15 flavonoid metabolites and 95 genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway were annotated. Correlation analysis revealed that the expression levels of genes such as CHI, HCT, CHS, FLS, F3H, and F3'H were significantly associated with flavonoid accumulation, indicating their regulatory roles in flavonoid biosynthesis. This is the first study to elucidate the flavonoid biosynthesis pathway and related genes in *R. chingii*, providing a theoretical basis for the biotechnological production of flavonoid compounds and offering significant value for the development of medicinal resources.

Key words: *Rubus chingii* Hu; metabolomics; transcriptomics; differential metabolites; flavonoid compounds; integrated analysis

掌叶覆盆子 *Rubus chingii* Hu 是蔷薇科悬钩子属藤状灌木植物,被列入药食同源植物名录,具有重要的食用价值和经济价值。作为传统中药材,覆盆子以干燥青果入药,富含类黄酮、酚酸、萜类、生物碱、有机酸、鞣质等功效成分^[1]。其中,黄酮类成分是悬钩子属中一类重要的活性物质,具有较强的抗氧化、抑菌、消除自由基抗过敏、抗肿瘤等多种药理活性,且毒性较低。覆盆子作为药用植物,干燥青果中的山柰酚-3-*O*-芸香糖苷含量是其药用价值判定的关键指标之一^[2]。还有研究发现覆盆子伪品软覆盆子、甜叶覆盆子、山莓、泼盘中均不存在山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,此特性可以作为品质指标在生产过程中有效筛选覆盆子伪品^[3]。基于现有研究,山柰酚、槲皮素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芦丁、紫云英苷、金丝桃苷等成分可能作为覆盆子黄酮类的质量标志物^[4]。对覆盆子黄酮类物质的形成机制进行研究有助于建立覆盆子质量标准评价体系。

迄今为止,研究人员已从覆盆子中鉴定出 20 余种黄酮类物质,包括芦丁、槲皮素、山柰酚及其衍生物等^[5-9]。不同产地覆盆子药材样品中,各种化合物含量存在差异显著。有研究显示,覆盆子总黄酮质量分数为 0.61 mg/g^[10],低于悬钩子属中的红树莓^[11],这可能与传统炮制工艺(多为直接干燥为主)导致产出率低和部分黄酮损失有关。由覆盆子根、茎、叶和果实的代谢物研究表明,不同组织中的黄酮类差异代谢物相对含量明显不同,其中根部黄酮类最为丰富,鞣花酸含量也高于其他部位^[12]。此外,还发现随着掌叶覆盆子果实的成熟,部分药用黄酮类物质含量,如槲树苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷等呈现逐渐降低的趋势^[13]。近年来,在覆盆子果实中发现了大量的类黄酮合成基因,包括结构基因查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄

烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)、黄酮醇合酶(flavonol synthase, FLS),以及转录因子基因 MYB44 (MYB transcription factor 44)、MYB46 (MYB transcription factor 46)、MYB308 (MYB transcription factor 308)、MYB4 (MYB transcription factor 4)、BHLH13 (basic helix-loop-helix 13) 和 BHLH63 (basic helix-loop-helix 63) 等基因^[14-15],然而,目前通过调控这些结构基因以影响黄酮类活性成分积累的关键转录因子的具体功能和机制仍未完全阐明。覆盆子在不同生长阶段黄酮类化合物含量的分子调控机制尚不清晰,很难通过传统的育种手段或基因工程方法来定向培育高黄酮含量的覆盆子品种,这制约了覆盆子次生代谢调控和分子辅助育种的发展。

为解析覆盆子黄酮生物合成的分子机制,本研究以不同时期的覆盆子果实为材料,系统分析其生长过程中储藏物质和活性物质的变化规律,探讨相关合成酶对黄酮积累的影响。同时,结合靶向代谢组学和转录组学对生长过程的 5 个时期(S1~S5)的黄酮代谢及相关基因表达进行动态分析,旨在通过联合分析挖掘覆盆子生长过程中的黄酮生物合成途径的关键基因及调控网络,为揭示覆盆子黄酮形成机制及品质调控提供理论依据。

1 材料

样品采集于浙江省杭州市淳安县龙岭塘(29° 58'N, 119° 7'E),经浙江理工大学生命科学与医药学院梁宗琐教授鉴定为蔷薇科植物掌叶覆盆子 *R. chingii* Hu。自 2023 年 4 月起,从 3 株不同植株上手工采摘果实,放置在 50 mL 离心管中,用液氮快速冷冻。进行 3 个单独的生物重复,每个重复至少包括 15 个果实。所有样品保存在-80 °C 的超低温冷冻室中。基于用途和产量,采集小青果实(S1)、

大青实 (S2)、绿转黄果实 (S3)、黄转红果实 (S4) 和红色果实 (S5), 颜色可用肉眼区分, 见图 1。设置 3 次重复。



图 1 覆盆子 5 个不同时期的表型

Fig. 1 *Rubus chingii* at different growth stages

2 方法

2.1 靶向代谢组样品制备和提取

冻干的果实加入 600 μ L 水-甲醇 (1:2, 含内标琥珀酸-2,2,3,3-d₄ 和水杨酸-d₄), 再加入 400 μ L 氯仿, 加入 2 颗小钢珠, 在 60 Hz 下粉碎 2 min。冰水浴超声 2 min, 离心 10 min, 取上清。残渣重复上述步骤 1 次。去上清, 挥干, 之后用 200 μ L 水: 甲醇 (18:7, 含内标 L-2-氯苯丙氨酸) 复溶, 涡旋 30 s, 超声 2 min, -20 $^{\circ}$ C 下静置 2 h, 离心, 取上清, 转移到棕色 LC 进样瓶中, -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 色谱质谱 (UPLC-ESI-MS/MS) 采集条件

2.2.1 色谱条件 样品提取物采用 UPLC-ESI-MS/MS (UPLC, Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM30A 系统, www.shimadzu.com.cn; MS, 应用生物系统。4500 Q TRAP, www.appliedbiosystems.com.cn)。采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 进行分离。流动相为含 0.1% 甲酸-水溶液 (A)-乙腈 (B)。梯度洗脱: 0~0.8 min, 95% A; 0.8~3.0 min, 95%~75% A; 3.0~12.0 min, 75%~56.2% A; 12.0~14.4 min, 56.2%~1% A; 14.4~15.0 min, 1%~95% A; 体积流量为 0.35 mL/min, 进样时间为 5 min。柱式烘箱设置为 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 4 μ L。

2.2.2 质谱条件 将废水交替连接到 ESI-三重四极线性离子阱-质谱仪。LIT 和三重四极杆扫描是在三重四极杆质谱的多反映检测模式进行分析, 该质谱仪配备了 ESI Turbo 离子喷雾界面, 工作在正离子和负离子模式下, 由 Analyst 1.6.3 软件 (AB Sciex) 控制。ESI 源操作参数为: 离子源, 涡轮喷雾; 源温度 500 $^{\circ}$ C; 离子喷雾电压 (IS) 5 500 V/-4 500 V (正离子模式/负离子模式); 离子源气体 I (GSI)、气体 II (GSII)、幕气 (CUR), 分别为 60、50、35 psi (1 psi=0.006 89 kPa); 碰撞气体 (CAD)。分别

以 10、100 μ mol/L 聚丙烯乙二醇溶液在 QQQ 和 LIT 模式下对仪器进行调谐和质量校准。QQQ 扫描是在碰撞气体 (氮气) 设置为 5 psi 的 MRM 实验中获得。每个 MRM 转换的 DP 和 CE 值都是单独优化的。根据在此期间洗脱的代谢物, 在每个时期监测一组特定的 MRM 转变。

2.3 统计分析

采用代谢物信息公共数据库以及 MVDB 数据库 (代谢物相关数据由上海鹿明生物提供), 用 Analyst 软件处理数据, 物质定性依据二级谱信息进行, 定量选用 MRM 进行。得到不同样本的代谢物质谱数据之后, 对所有物质质谱峰进行峰面积积分, 并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正^[16]。采用多元统计分析, 对样本分别进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), 选取 fold change (FC) ≤ 0.5 和 $\log_2$ FC ≥ 1 且 VIP ≥ 1 测定各组间代谢物差异显著, 展示各分组之间的变异度^[17]。从 PLS-DA 结果中提取 VIP 值, 并使用 R 软件包 MetaboAnalystR 生成评分图和排列图。在 PLS-DA 之前, 数据以对数变换 ($\log_2$) 和均值为中心。为了避免过拟合, 进行了一次排列检验 (200 个排列)。鉴定的代谢物使用 KEGG 化合物数据库进行注释, 然后将注释的代谢物映射到 KEGG 通路数据库。然后利用显著调节代谢物绘制的通路进行代谢物富集分析 (multiple reaction monitoring, MRM), 并通过计算 P 值确定其显著性。

2.4 总 RNA 提取、文库构建、测序及转录本组装

使用 RNAPrep Prue Plant Plus Kit (TIANGEN DP441) 提取样品总 RNA, 使用 Nano Photometer spectrophotometer、Qubit 和 Agilent 2100 分别检测 RNA 样品的纯度、浓度, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳 (80 V) 检测样品 RNA 的完整性和污染性。构建测序文库采用 Illumina 试剂盒 (NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit); AMPure beads 纯化文库片段, 最终获得文库; 文库构建完成后, 使用生物分析仪 (Agilent 2100) 和荧光计 (Qubit 2.0) 进行文库检测, Q-PCR 对文库有效浓度进行检测, 以确保文库质量合格。将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量进行 pooling, 然后进行 Illumina Hiseq 高通量测序平台进行测序 (由武汉迈维代谢生物科技有限公司完成)。

使用 fastp 软件对原始数据进行过滤得到高质量序列 (Clean reads)。过滤标准如下: (1) 剔除带接头 (adapter) 的 reads; (2) 当任一测序 reads 中 N 含量超过该 reads 碱基数的 10% 时, 去除此 paired reads; (3) 当任一测序 reads 中含有的低质量 ($Q \leq 20$) 碱基数超过该条 reads 碱基数的 50% 时, 去除此 paired reads。获得的 clean reads 使用 Trinity 软件进行拼接, 得到转录本序列, 使用 Corset 对组装得到的转录本进行聚类去冗余获得 Unigenes。并进一步使用 HMMER 软件与功能数据库比对, 获得 Unigene 的注释信息。

2.5 差异基因分析

以每千个碱基的转录每百万映射读取的 fragments (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM) 作为衡量基因表达水平的指标, 对基因长度与测序深度进行归一化处理。采用 DESeq 软件进行样品组间的差异表达分析。使用 Benjamini-Hochberg 方法校正 P 值, 得到错误发现率 (false discovery rate, FDR)。差异基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选条件为 $|\log_2 FC| \geq 1$, 且 $FDR < 0.05$ ^[18]。获得差异基因后进行 KEGG 注释和富集分析。

2.6 转录组与代谢组联合分析

结合转录组学和代谢组学, 找到两组学富集到共同 KEGG 通路的基因和代谢物。利用 R 中的 cor 函数计算通路中差异基因和差异代谢物的皮尔逊相关性系数, 相关性显著条件为皮尔逊相关系数 > 0.80 且 $P < 0.05$, 利用 Cytoscape 做相关性网络图。

3 结果与分析

3.1 差异代谢物的分析

3.1.1 多元统计分析 采用多元统计分析代谢组数据, 可以最大程度地保留原始信息, 并将庞大复杂的数据进行简化和降维处理。利用 UPLC-ESI-MS/MS 对覆盆子果实的代谢组进行分析, 共检测到 87 个代谢物。对 S1~S5 的代谢物进行 PCA 分析和 PLS-DA 分析。PCA 评分结果 (图 2) 显示, PC1 的贡献率为 70.9%, PC2 的贡献率为 19.7%, 模型的累积贡献率为 0.84, 表明该 PCA 模型拟合性较好。样本全部置于 95% 置信区间内, 在总体分布上, S1、S4、S5 各比较组之间的主成分 PC1 上分离明显, S2、S3 在 PC1 上分离不明显, 但在 PC2 上存在显著分离, 因此, 各样品数据处理结果可信, 能从总体上反映出不同生长时期覆盆子果实之间的代谢物差异。

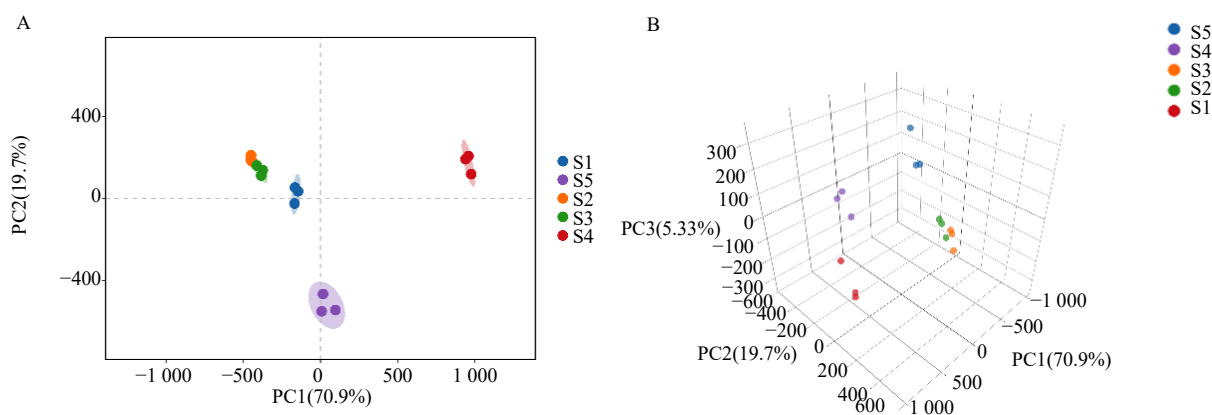


图 2 二维 (A) 和三维 (B) PCA

Fig. 2 Two-dimensional (A) and three-dimensional (B) principal component analysis

为了获得更精确的结果, 通过放大组间差异, 同时缩小组内差异, 过滤掉与分类无关的信息, 运用偏最小二乘回归建立代谢物表达量与样品类别之间的关系模型, R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 , 分别表示 PLS-DA 模型对 X 和 Y 矩阵的解释率和预测能力, 3 项数值越接近 1 表示可信度越高。由图 3-A 可知, 该模型的 $R^2_X = 0.989$ 、 $R^2_Y = 0.989$ 、 $Q^2 = 0.973$, 样本全部处于 95% 置信区间内, 表明该模

型预测能力较好, 可以用于后续的差异代谢物筛选分析。

经 7 次循环交互验证和 200 次响应排序检验得到的模型评价参数, 如图 3-B 所示, 该模型累计预测率 $Q^2 < 0$, 且所有绿色 Q^2 从左至右始终低于原始 Q^2 点, 且 R^2 和 Q^2 的回归线与横坐标相交值均小于 0, 表明该模型稳定性较好且有效, 不存在过度拟合现象。

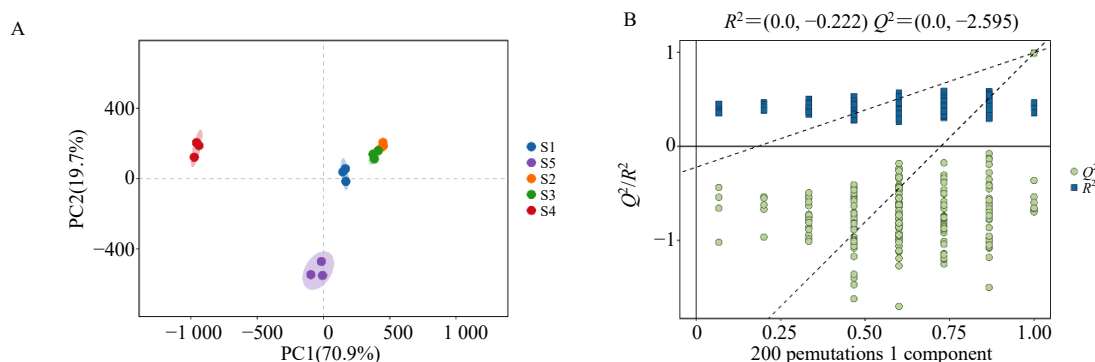
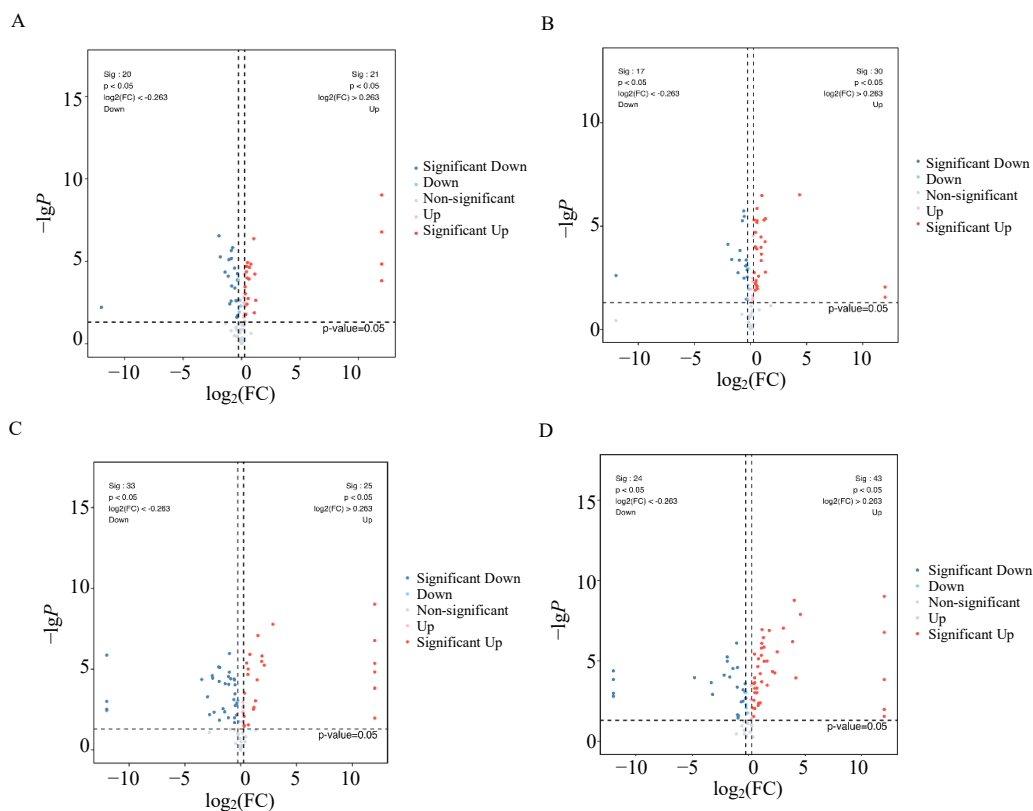


图 3 代谢组学数据的 PLS-DA 得分图 (A) 和置换检验图 (B)

Fig. 3 PLS-DA score plot (A) and permutation test plot (B) of metabolomic data

3.1.2 差异代谢物筛选 基于 PLS-DA 结果, VIP 值 >1 且 P 值 <0.05 , 得到物质火山图 (图 4)。分别对以上有差异的 5 个生长时期 (S1~S5) 的差异代谢物进行对比, S1 与其他 4 组对比, 共 4 个对比组, 筛选所得差异代谢物显著的结果以火山图的形式显示, 筛选的差异代谢物数量见表 1。如图 4-A 为 S1 vs S2 差异代谢火山图, 共筛选出 41 个差异显著的代谢物, 其中显著上调 21 种代谢物质, 显著下调 20

种代谢物质。如图 4-B 为 S1 vs S3 差异代谢火山图, 共筛选出 47 个差异显著的代谢物, 显著上调 30 种代谢物质, 显著下调 17 种代谢物质。如图 4-C 为 S1 vs S4 差异代谢火山图, 共筛选出 58 个差异显著的代谢物, 显著上调 25 种代谢物质, 显著下调 33 种代谢物质。如图 4-D 为 S1 vs S5 差异代谢火山图, 共筛选出 67 个差异显著的代谢物, 显著上调 43 种代谢物质, 显著下调 24 种代谢物质。



A- “S1 vs S2”; B- “S1 vs S3”; C- “S1 vs S4”; D- “S1 vs S5”; 图 7~12 同。

A-“S1 vs S2”; B-“S1 vs S3”; C-“S1 vs S4”; D-“S1 vs S5”; same as Fig.7~12.

图 4 差异代谢物火山图

Fig. 4 Volcano plot of differential metabolites

表 1 各对比组差异代谢物数量

Table 1 Number of differential metabolites in each comparison group

对比组	差异代谢物总数	上调	下调
S1 vs S2	41	21	20
S1 vs S3	47	30	17
S1 vs S4	58	25	33
S1 vs S5	67	43	24

3.1.3 差异代谢物的聚类分析 为便于观察代谢变化,对差异显著的代谢物采用单位方差(UV)标度归一化,并通过 R 软件生成热图,评价所选代谢物的合理性。图 5 聚类结果显示,在 5 个不同发育阶段中各组 3 个平行实验颜色均相似,表明各组平行样品重复性较好;各比较组间颜色有

明显差异,表明各组间代谢物差异显著,数据可信度高。总体上,相对含量减少的代谢物较多,可能与覆盆子果实发育调控密切相关。结果显示,香橙素、芹菜素和紫云英苷在 S1 中含量较高;槲皮素、山柰酚和圣草酚在 S2 中含量较高;花旗松素和木犀草素在 S3 中含量较高;紫云英苷、柚皮素、根皮素、根皮苷和乔松素在 S4 中含量较高;山柰酚-3-O-芸香糖苷、芦丁、金丝桃苷、槲皮素 3-O-葡萄糖酸苷、斛皮苷在 S5 中含量较高。图 5 为覆盆子黄酮类化学成分及药理作用的质量标志物为山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、山柰酚、槲皮素、金丝桃苷,芦丁在不同生长时期的差异表达。图 6 为 5 个不同生长时期覆盆子黄酮类重要标志物的相对含量。

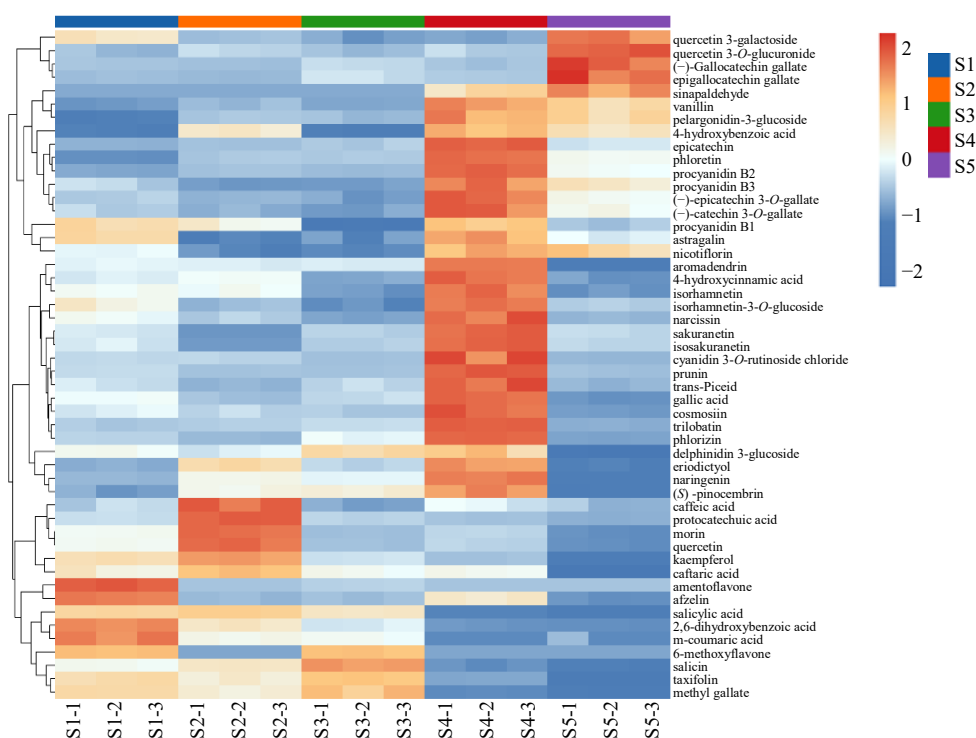


图 5 基于代谢组学的不同生长时期覆盆子果实样本聚类

Fig. 5 Clustering of *R. chingii* samples at different growth stages based on metabolomics

3.1.4 基于差异代谢物的 KEGG 代谢途径富集分析 KEGG 数据库是分析代谢途径及其关系的重要工具,通过图形和表格表示不同的代谢途径。最后,本研究利用 KEGG 数据库丰富了在覆盆子果实不同生长时间发现的差异代谢物,以获得其功能的全面信息。KEGG 富集分析发现差异积累代谢物(DAMs)主要富集于类黄酮降解、黄酮类生物合成通路、黄酮和黄酮醇的生物合成途径、长寿调节通

路和植物激素信号转导通路(图 7)。采用 KEGG 对 S1 vs S2(图 7-A)、S1 vs S3(图 7-B)、S1 vs S4(图 7-C)、S1 vs S5(图 7-D)差异代谢物进行分析,选择与黄酮类生物合成有关的富集通路进行分析。结果表明 S1 vs S2 参与形成黄酮类化合物的通路主要为黄酮类生物合成通路(ko00941)、黄酮和黄酮醇的生物合成通路(ko00944)和异黄酮生物合成通路(ko00943),富集到的 DAMs 分别为 11

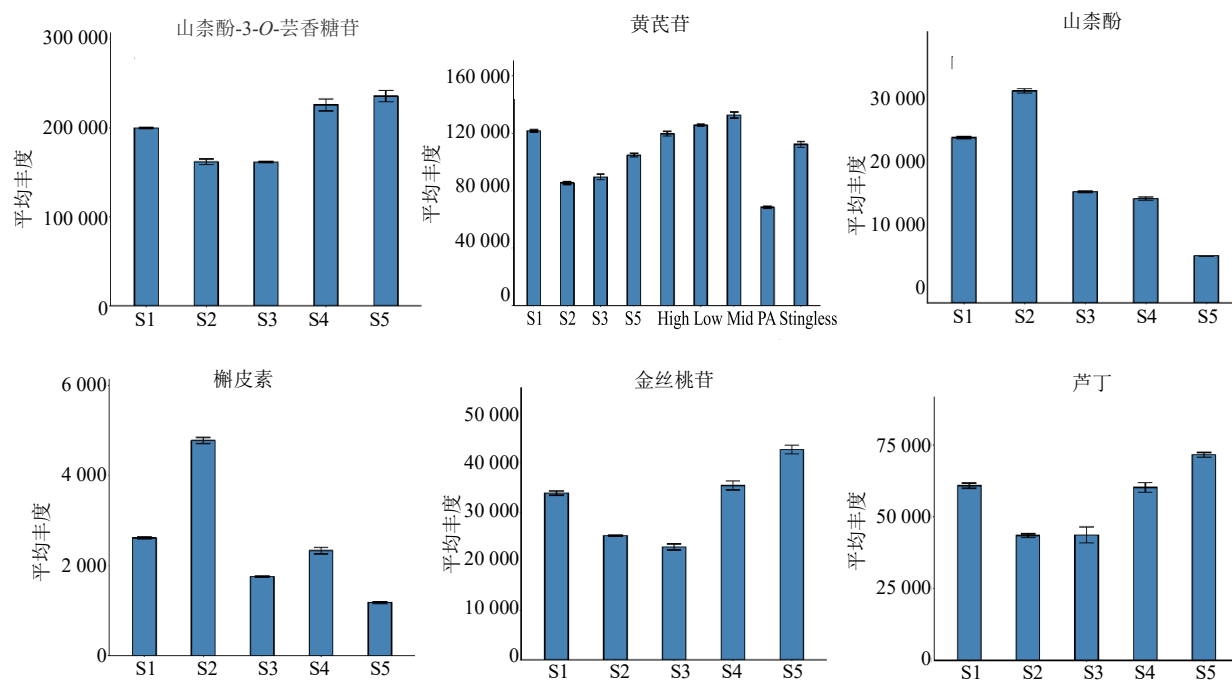


图 6 不同生长时期覆盆子中黄酮类化合物相对含量

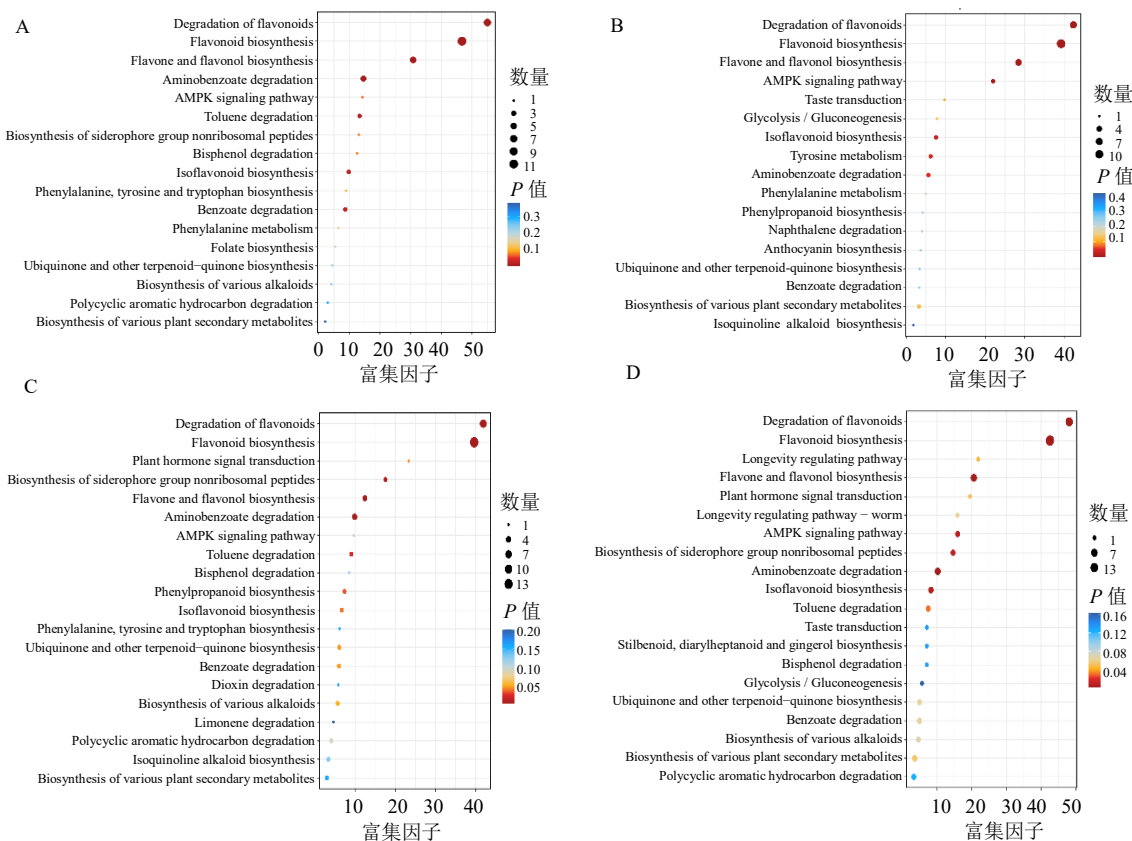
Fig. 6 Relative content of flavonoids in *R. chingii* at different growth stages

图 7 不同生长时期差异代谢物的 KEGG 代谢途径富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites at different growth stages

个、7 个和 2 个；S1 vs S3 富集到的 DAMs 分别为 12 个、6 个和 2 个；S1 vs S4 富集到的 DAMs 分别为 14 个、3 个和 2 个；S1 vs S5 富集到的 DAMs 分别为 18 个、6 个和 3 个。5 个不同时期差异代谢物参与黄酮类生物合成通路 (ko00941)、黄酮和黄酮醇的生物合成通路 (ko00944) 和异黄酮生物合成通路 (ko00943)，富集到的 DAMs 分别为 20 个、8 个和 4 个。

3.2 转录组分析

剔除低质量序列后，在覆盆子果实 15 个样本

中共获得 114.7 Gb 的 Clean data，每个样品均达到 6.23 M Clean reads 以上，各样本 Q_{30} 碱基占 92.3% 及以上，GC 平均含量为 46.08%，说明转录组测序数据有较高的质量 (表 2)。

3.2.1 差异表达基因筛选 火山图能够直观展示组间样品的基因表达水平的差异程度和显著性。根据 RNA-seq 结果，以 $|\log_2FC| \geq 1$ ，且 $FDR < 0.05$ 为标准，筛选 DEGs，对覆盆子不同生长阶段的差异表达火山图如图 8 所示。结果表明，S1 vs S2 有 2 354 个差异基因表达，其中有 1 001 个上调 (图

表 2 转录组测序数据质量控制统计

Table 2 Quality control statistics of transcriptome sequencing data

样品	过滤前reads数	过滤后reads数	过滤后碱基总数 (G)	Q_{30} 碱基占比/%	GC/%
S1-1	56 930 188	54 682 850	8.20	93.10	46.09
S1-2	64 292 120	62 107 598	9.32	93.03	46.10
S1-3	46 363 888	45 300 334	6.80	93.45	46.29
S2-1	46 363 888	54 103 788	8.12	92.97	45.85
S2-2	63 928 616	61 658 948	9.25	93.15	45.78
S2-3	74 858 432	73 138 464	10.97	94.15	46.29
S3-1	74 858 432	45 935 240	6.89	92.42	45.94
S3-2	44 731 068	43 590 066	6.54	92.30	45.85
S3-3	44 954 200	43 446 468	6.52	92.45	45.96
S4-1	46 363 888	51 138 866	7.67	93.51	46.39
S4-2	51 413 542	50 155 404	7.52	93.80	46.15
S4-3	42 327 632	41 507 496	6.23	93.02	46.20
S5-1	46 918 142	41 507 496	6.79	92.71	45.85
S5-2	45 704 986	44 086 764	6.61	92.53	46.35
S5-3	46 227 698	44 914 436	6.74	92.34	46.12

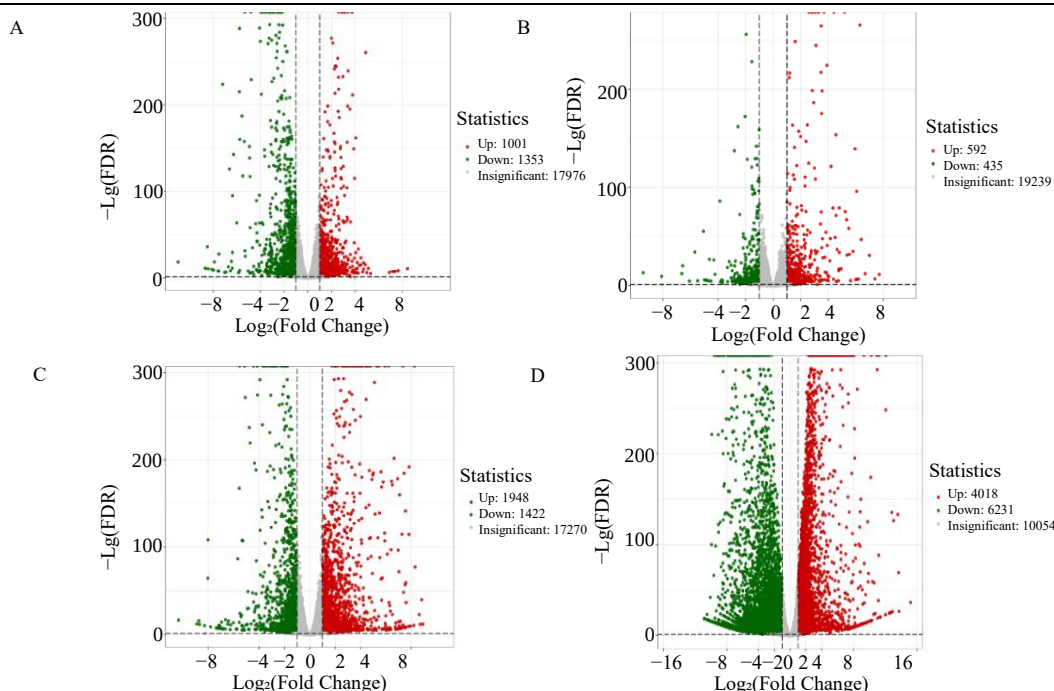


图 8 不同生长时期差异基因火山图

Fig. 8 Volcano plot of differentially expressed genes at different growth stages

8-A); “S1 vs S3” 有 1 027 个差异基因表达, 其中有 592 个上调 (图 8-B); “S1 vs S4” 有 3 370 个差异基因表达, 其中有 1 948 个上调 (图 8-C), “S1 vs S5” 有 10 249 个差异基因表达, 其中有 4 018 个基因上调 (图 8-D)。各对比组差异基因数量统计见表 3。

表 3 各对比组差异基因数量

Table 3 Number of differentially expressed genes in each comparison group

对比组	差异基因总数	上调	下调
S2 vs S1	2 354	1 001	1 353
S3 vs S1	1 027	592	435
S4 vs S1	3 370	1 948	1 179
S5 vs S1	10 249	4 018	1 422

3.2.2 差异表达基因富集分析 KEGG 分析结果显示 (图 9), DEGs 主要分为细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、新陈代谢和生物系统的 KEGG 途径。对 “S1 vs S2” “S1 vs S3” “S1 vs S4” “S1 vs S5” 共 4 个比较组的差异表达基因 KEGG

分析, 分别富集到 126、99、138、146 条代谢通路。在 “S1 vs S2” 中 DEGs 富集最多的前 5 条 KEGG 途径为次级代谢产物的生物合成、植物-病原体的相互作用、光合作用-天线蛋白、 α -亚麻酸代谢、苯丙素生物合成途径。在 “S1 vs S3” 中 DEGs 最多的前 5 条 KEGG 途径为次级代谢产物的生物合成、角质、木栓质和蜡的生物合成、黄酮类的生物合成、异黄酮类的生物合成、代谢途径。在 “S1 vs S4” 中 DEGs 最多的前 5 条 KEGG 途径为次级代谢物的生物合成、脂肪酸生物合成、代谢途径、脂肪酸代谢、异黄酮类生物合成途径。在 “S1 vs S5” 中 DEGs 最多的前 5 条 KEGG 途径为次级代谢产物的生物合成、代谢途径、碳代谢、光合作用-天线蛋白、氨基酸的生物合成途径。参与形成黄酮类化合物的通路共富集到 277 个与黄酮合成相关的差异基因, 其中黄酮类、黄酮和黄酮醇和异黄酮生物合成通路分别富集到 59、16、48 个 DEGs。

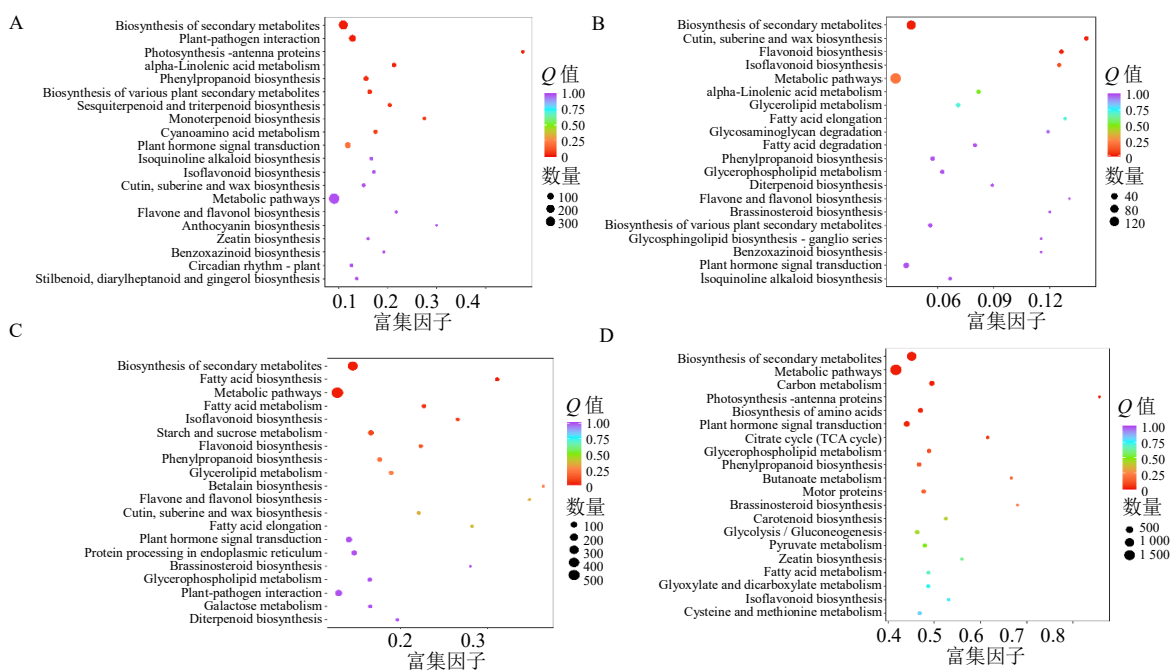


图 9 不同生长时期差异基因的 KEGG 富集通路

Fig. 9 KEGG enrichment pathways of differentially expressed genes at different growth stages

3.3 转录组学与代谢学组联合分析

3.3.1 差异代谢物与差异基因相关性分析 根据覆盆子生长过程中同一时期的代谢组和转录组数据相关性, 筛选皮尔逊相关系数 (r) > 0.80 且 P 值 < 0.05 的差异代谢物和差异基因进行相关性分析, 并绘制相关性聚类热图, 如图 10 所示。图 10-

A 为 “S1 vs S2”, 图 10-B 为 “S1 vs S3”, 图 10-C 为 “S1 vs S4”, 图 10-D 为 “S1 vs S5”, 由图 10 可看出, 各个比较组中的代谢物及代谢基因均被聚为 2 大类。差异代谢包括黄酮类和酚酸类, 黄酮类占比最高。各比较组的代谢物和基因均差异明显, 且差异代谢物和差异基因关系紧密。

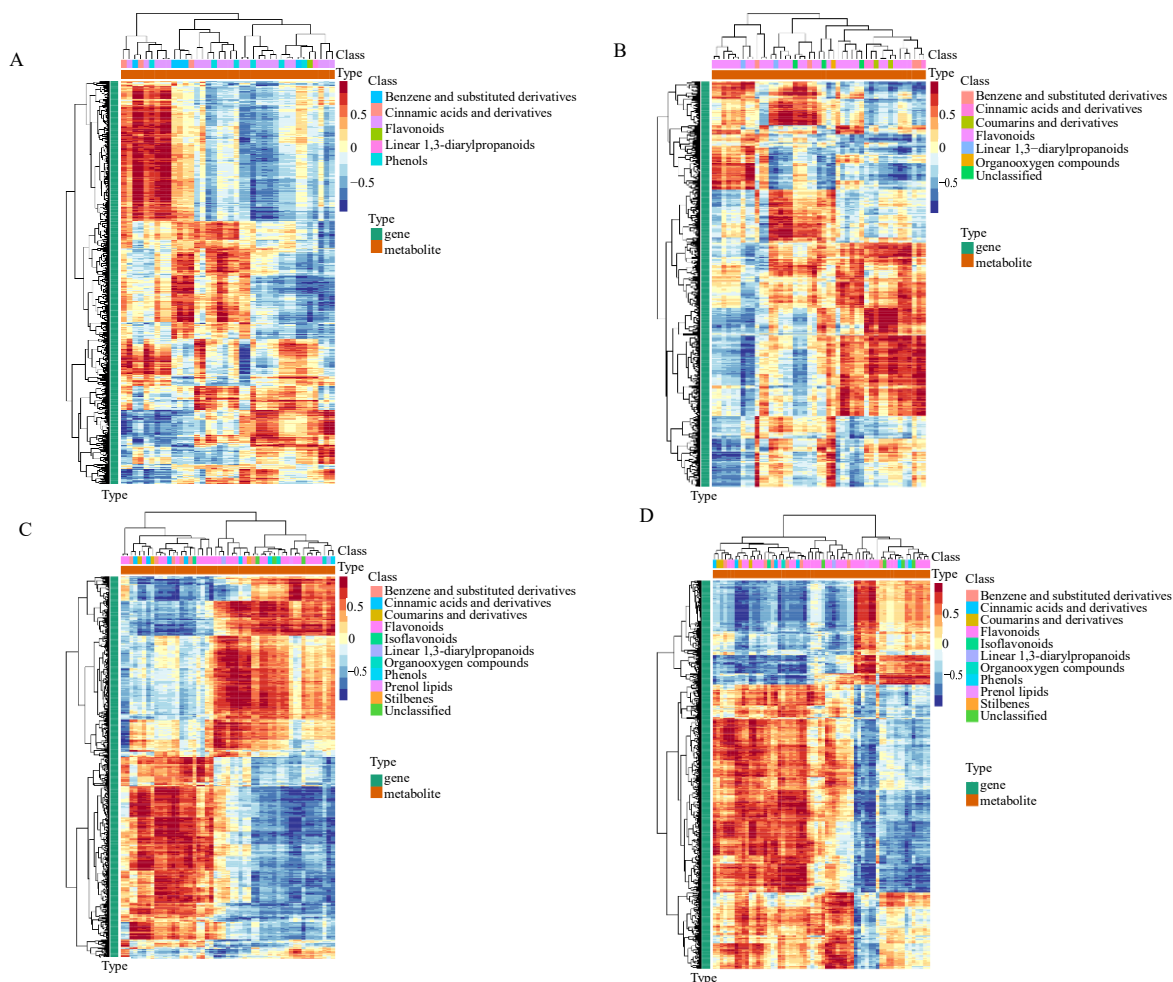


图 10 差异代谢物和差异基因的相关性聚类热图

Fig. 10 Correlation cluster heatmap of differential metabolites and differential genes

3.3.2 不同生长时期黄酮生物合成途径 KEGG 分析 结合富集分析, 进行黄酮生物合成相关途径的分析, 结果表明“S1 vs S2”“S1 vs S3”“S1 vs S4”“S1 vs S5”均存在显著富集的与黄酮合成相关的途径, 如图 11 所示为富集到各相关通路的差异代谢物和 DEGs 数量信息的条状图。图 11-A 中“S1 vs S2”共 58 个 DEGs, 其中类黄酮生物合成有 32 个 DEGs, 异黄酮生物合成有 18 个 DEGs, 黄酮和黄酮醇的生物合成有 8 个 DEGs。图 11-B 中“S1 vs S3”共 42 个 DEGs 其中类黄酮生物合成有 25 个 DEGs, 异黄酮生物合成有 14 个 DEGs, 黄酮和黄酮醇的生物合成有 3 个 DEGs。图 11-C 中“S1 vs S4”共 87 个 DEGs 其中类黄酮生物合成有 48 个 DEGs, 异黄酮生物合成有 31 个 DEGs, 黄酮和黄酮醇的生物合成有 8 个 DEGs。图 11-D 中“S1 vs S5”共 150 个 DEGs 其中类黄酮生物合

成有 90 个 DEGs, 异黄酮生物合成有 46 个 DEGs, 黄酮和黄酮醇的生物合成有 14 个 DEGs。

随着果实成熟, DEGs 数量显著增加, 尤其在“S1 vs S5”中达到最高 (150 个 DEGs), 其中类黄酮、异黄酮以及黄酮和黄酮醇生物合成路径的 DEGs 分别为 90、46 和 14 个, 表明果实成熟后期是黄酮合成代谢加速积累的关键时期。这些结果显示多条黄酮合成通路在覆盆子果实不同发育阶段中的协同调控作用, 为进一步解析黄酮类物质积累机制提供了分子基础。

3.3.3 相关性网络分析 进一步将覆盆子黄酮生物合成相关途径的差异表达基因和差异代谢物进行相关性分析, 通过网络图来显示其相关关系。选择显著富集的类黄酮生物合成 (Ko00941) 进行分析。图中绿色方框为代谢物, 红色圆圈为基因, 实线为正相关, 虚线为负相关。

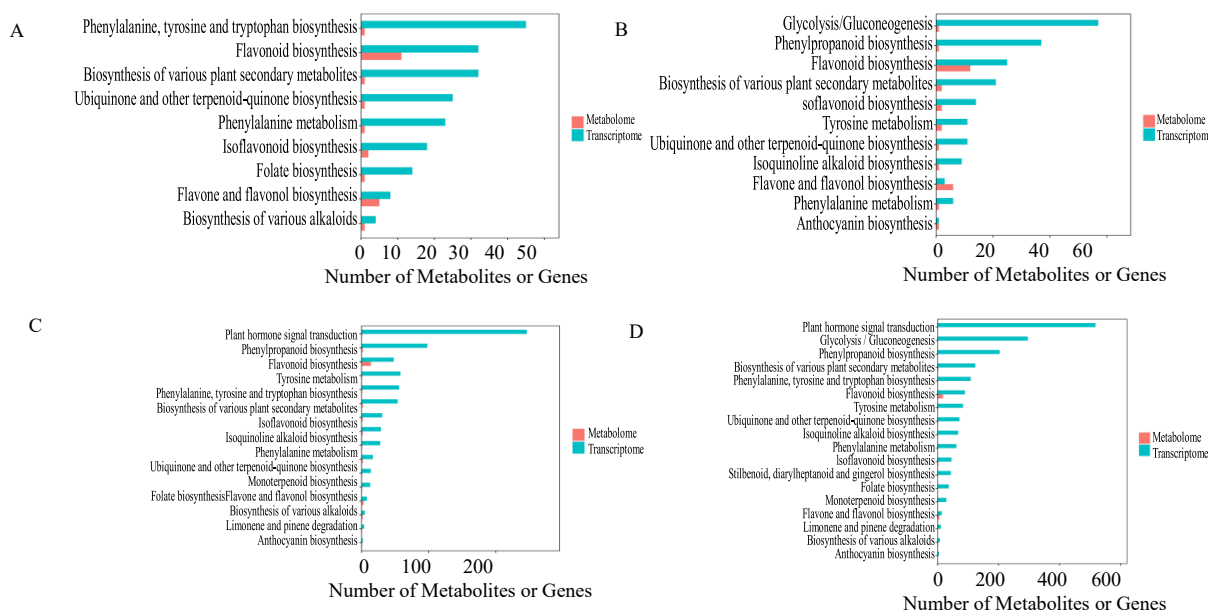


图 11 不同生长时期富集到的黄酮生物合成途径分类图

Fig. 11 Classification diagram of flavonoid biosynthesis pathways enriched at different growth stages

图 12-A 展示了“S1 vs S2”中参与黄酮合成的差异表达基因和差异累计代谢物的相关性。其中，樱桃苷与花青素还原酶（anthocyanidin reductase, ANR）和 C4H 呈极显著正相关。表儿茶素与 ANR 呈极显著正相关。白杨素与对羟基肉桂酰转移酶（hydroxycinnamoyl transferase, HCT）和二氢黄酮醇还原酶（dihydroflavonol-4-reductase, DFR）呈极显著负相关。根皮素与 HCT、DFR、CHI 呈极显著负相关。山柰酚与 F3H、HCT 呈极显著正相关，而与没食子酰转移酶（phloroglucinol transferase, PGT）呈极显著负相关。圣草酚与 CHI、PGT、HCT 呈极显著正相关。柚皮素与 CHI、HCT 呈极显著正相关。

图 12-B 展示了“S1 vs S3”中参与黄酮合成的差异表达基因和差异累计代谢物的相关性。其中，根皮素与 CHS、花青素合酶（anthocyanidin synthase, ANS）、HCT、DFR、CHI、FLS、白花色素还原酶（Leucoanthocyanidin reductase, LAR）呈极显著负相关。山柰酚与 CHS、DFR、CHI、LAR、F3H、HCT 呈极显著正相关。槲皮素与 CHI、CHS、HCT 呈极显著正相关。

图 12-C 展示了“S1 vs S4”中参与黄酮合成的差异表达基因和差异累计代谢物的相关性。其中，柚皮素与香豆酸-3'-羟化酶（p-coumarate 3'-hydroxylase, C3'H）、CHI、HCT 呈极显著正相关。花旗松素与 HCT、CHS、DFR、C3'H、FLS、PGT、

咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。香橙素与花青素合酶（anthocyanidin synthase, ANS）、HCT、CHS、DFR、CHI、F3H、C3'H、FLS、LAR、ANR、PGT、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。乔松素与 C3'H、CHI、ANR 呈极显著正相关。表儿茶素与 C3'H 和 ANR 呈极显著正相关。山柰酚与 ANS、HCT、CHS、DFR、CHI、F3H、C3'H、FLS、LAR、PGT、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关，与 ANR 呈极显著正相关。圣草酚与 CHI 和 HCT 呈极显著正相关。根皮素与 CHS、F3H、PGT、ANS、HCT、DFR、CHI、FLS、LAR 呈极显著负相关。异甘草素与 C3'H、CHI 呈极显著正相关。

图 12-D 展示了“S1 vs S5”中参与黄酮合成的差异表达基因和差异累计代谢物的相关性。其中，花旗松素与 HCT、CHS、DFR、咖啡酰 CoA-甲基转移酶、细胞色素 P450 单加氧酶（cytochrome P450 monooxygenase, CYP73A）、CYP98A 呈极显著正相关，与 FLS 呈极显著负相关。香橙素与 ANS、HCT、CHS、DFR、CHI、F3H、F3'H、CYP73A、FLS、LAR、ANR、PGT、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。槲皮素与 CHI、HCT、F3H、CHI、CHS、F3'H、PGT 呈极显著正相关。乔松素与 CHR、ANR 呈极显著正相关。表儿茶素与 C3'H 和 ANR 呈极显著正相关。山柰酚与 HCT、CHS、DFR、CHI、F3H、F3'H、FLS、LAR、PGT、ANR 呈极显著正相关。根皮素与 CHS、F3H、ANS、HCT、DFR、CHI、FLS、

LAR、*ANR*、咖啡酰 CoA-甲基转移酶、*CYP98A*、*CYP73A* 呈极显著负相关。异甘草素与 *C3'H*、*CHI* 呈极显著正相关。芹菜素与 *HCT*、*CHI*、*DFR*、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关，与 *PGT*、*FLS* 呈极显著负相关。白杨素与 *HCT*、*DFR*、*HGT*、*CYP73A* 呈极显著负相关，与 *PGT* 呈极显著正相关。异甘草素与 *CHI*、*HCT*、*CHR*、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。表儿茶素与 *ANR* 呈极显著正相关。柚皮素与 *HCT*、*CHI*、*CHR*、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。根皮苷与 *ANR*、*HCT*、

CYP73A、咖啡酰 CoA-甲基转移酶呈极显著正相关。根皮苷与 *ANR*、*HCT*、*CHR*、*CYP73A* 呈极显著正相关。

综上所述，根据 5 个时期重要的差异代谢物和差异基因的相关性聚类热图分析结果，筛选得到参与黄酮类生物合成途径的 95 个关键基因和 15 个关键差异代谢物，将这些代谢物进行相关性分析。结果表明，有 45 个关键基因和 14 个关键差异代谢物显著相关（图 12-E），说明这些基因参与黄酮类化合物的生物合成。

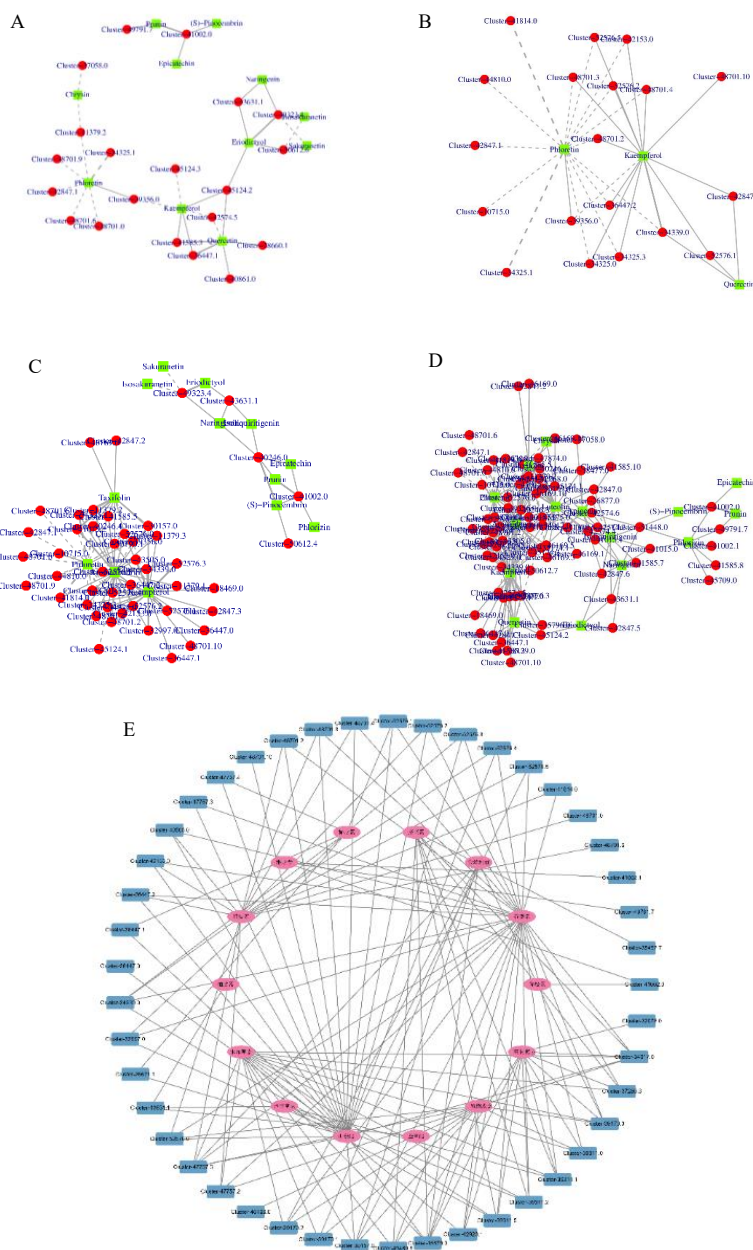


图 12 参与黄酮合成的差异基因 (A~D) 和差异代谢物 (E) 相关性网络图

Fig. 12 Correlation network of differential genes (A~D) and differential metabolites (E) involved in flavonoid biosynthesis

3.4 覆盆子黄酮类化合物生物合成途径分析

为了研究覆盆子果实发育过程中黄酮类物质的变化, 基于 KEGG 图和先前报道过的类黄酮生物合成途径^[19]重建了类黄酮生物合成途径。根据转录组与代谢组联合分析和植物的黄酮类化合物合成途径研究, 预测覆盆子黄酮类化合物生物合成途径(图 13)。在覆盆子黄酮类化合物合成途径中, 苯丙氨酸在 PAL、C4H 及 4CL 等的作用下形成黄酮类化合物的底物香豆酰辅酶 A。香豆酰辅酶 A 进一步在 CHS 的作用下形成柚皮素查耳酮、乔松素、根皮素和异甘草素, 然后分别由 CHI、F3H、F3'H 和 F3',5'H 等酶作用生成黄酮类化合物。

柚皮素是一种重要的黄酮代谢中间产物,参与

其他黄酮类成分的合成途径^[24]，其含量在 S5 时期时高于其他 4 个时期，为上调代谢物（表 4），参与合成柚皮素的上游酶基因 *C4H*、*CHS*、*F3H* 和 *CHI* 均为上调基因，*4CL* 的总体表达量趋于上调（表 5）。柚皮素在上调酶基因 *F3'H* 和 *F3',5'H* 的催化下形成上调代谢物圣草酚；在上调酶基因 *F3H*、*F3'H* 的催化下形成上调代谢物二氢槲皮素；而在 *FNS* 的催化下形成芹菜素上调代谢物。覆盆子黄酮类生物合成上的大部分差异酶基因均为上调基因，这些基因可能正向调控山柰酚、圣草酚、乔松素、柚皮素等化合物的代谢合成，反向调控根皮素和二氢杨梅素等化合物的代谢合成，因此认为 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *FNS* 在覆盆子黄酮类生物合成途径中起着重要作用。

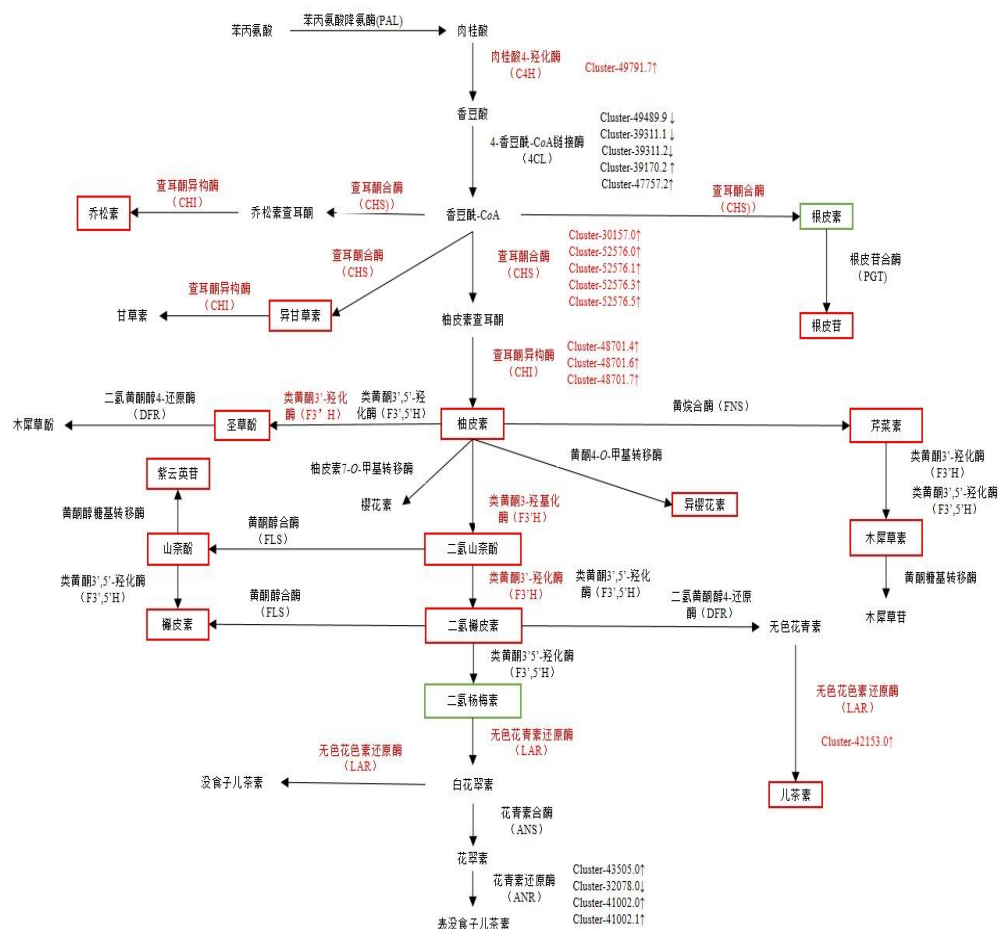


图 13 覆盆子黄酮类生物合成途径

Fig. 13 Flavonoid biosynthesis pathway in *R. chingii*

4 讨论

开展药用植物中药用成分如黄酮类成分的生物合成调控研究,对于发掘植物功能基因和揭示其分子调控机制具有重要的理论意义,对黄酮类物质的

积累具有重要的现实意义^[20-21]。黄酮类化合物是覆盆子中重要的药理化合物,在不同的发育阶段具有不同的含量,但潜在的不同分子机制仍然难以琢磨。本研究的目的是揭示了不同生长时期覆盆子的黄酮

表 4 覆盆子 “S1 vs S5” 中部分黄酮类差异代谢物
Table 4 Selected differential flavonoid metabolites in *R. chingii* “S1 vs S5”

代谢物	CID号	log ₂ FC	表达类型
柚皮素	C00509	0.862 144 000	上调
山柰酚	C05903	1.808 376 000	上调
槲皮素	C00389	1.149 503 040	上调
芹菜素	C01477	0.823 402 000	上调
金丝桃苷	C10073	-1.912 537 238	下调
根皮素	C00774	-1.074 888 830	下调
乔松素	C09827	0.534 525 500	上调
香橙素	C00974	1.164 789 563	上调
木犀草素	C01514	0.801 016 259	上调
异樱花素	C05334	0.420 253 777	上调
根皮苷	C01604	0.498 111 348	上调
异甘草素	C08650	0.709 585 497	上调
圣草酚	C05631	0.525 496 983	上调
二氢杨梅素	C02906	-15.000 000 000	下调
二氢槲皮素	C01617	3.872 351 000	上调

生物合成机制,分析覆盆子生长过程中储藏物质和主要活性物质的动态变化。利用代谢组学和转录组学分析了覆盆子生长过程中的差异代谢物和差异表达基因,联合分析解析了黄酮化合物在覆盆子生长过程中的生物合成机制。在覆盆子果实发育过程中,不同生长时期的化学成分含量差异显著,利用 UPLC-MS/MS 分析共检测出 51 种黄酮类差异代谢物,再通过与转录组关联分析得到富集到 KEGG 通路上的黄酮类差异代谢物有 15 个,分别为柚皮素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、山柰酚、槲皮素、紫云英苷、根皮苷、根皮素、芹菜素、花旗松素、香橙素、异甘草素、木犀草素、乔松素、樱桃苷、表儿茶素。根据差异代谢物的分析结果来看,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖酸苷、斛皮苷在 S5 时期含量最高,其中山柰酚-3-*O*-芸香糖苷作为覆盆子果实的标志性有效成分,在 S4、S5 时期呈现增长趋势,在 S2、S3 时期含量明显下降,所以在采收时应当考虑山柰酚-3-*O*-芸香糖苷含量最高的 S5 时期的果实从而提高药材质量。后续可对覆盆子不同部位及不同品种的山柰酚-3-*O*-芸香糖苷以及其他几种质量标志物的含量进一步探讨,为探究其他部位黄酮类物质的变化对覆盆子果实中含量的影响。

植物中黄酮类化合物的结构多样性很大程度上源于在其合成途径中各合成酶具有不同催化活性和特异性,尽管黄酮类化合物数量大、类型繁多,

表 5 覆盆子 “S1 vs S5” 中黄酮类生物合成途径相关基因
Table 5 Genes related to flavonoid biosynthesis pathway in *R. chingii* “S1 vs S5”

基因	KO号	基因编号	log ₂ FC	表达类型
<i>C4H</i>	K00487	Cluster-49791.7	7.963 130 906	上调
<i>4CL</i>	K01904	Cluster-26671.1	6.554 466 994	上调
		Cluster-37280.3	-1.444 278 037	下调
		Cluster-39170.0	6.015 162 083	上调
		Cluster-39170.1	4.523 543 225	上调
		Cluster-39170.2	11.386 520 700	上调
		Cluster-39311.0	-2.636 100 190	下调
		Cluster-39311.1	-5.305 402 768	下调
		Cluster-39311.2	-12.93 837 821	下调
		Cluster-39311.5	-2.878 114 554	下调
		Cluster-39492.7	-2.874 484 482	下调
		Cluster-42923.1	2.158 089 480	上调
		Cluster-47757.2	7.004 663 000	上调
		Cluster-47757.3	5.818 728 000	上调
		Cluster-47757.4	5.133 999 000	上调
		Cluster-47757.5	4.029 336 000	上调
		Cluster-49489.9	-10.080 800 000	下调
<i>CHS</i>	K00660	Cluster-30157.0	7.497 599 000	上调
		Cluster-52576.0	7.322 174 000	上调
		Cluster-52576.1	10.255 890 000	上调
		Cluster-52576.2	6.537 824 000	上调
		Cluster-52576.3	10.474 040 000	上调
		Cluster-52576.4	6.840 612 000	上调
		Cluster-52576.5	7.804 360 000	上调
<i>CHI</i>	K01859	Cluster-34339.0	5.773 511 000	上调
		Cluster-34917.0	3.587 097 000	上调
		Cluster-43631.1	2.668 071 000	上调
		Cluster-48701.0	3.497 925 000	上调
		Cluster-48701.10	8.712 068 000	上调
		Cluster-48701.2	7.086 450 000	上调
		Cluster-48701.3	5.911 554 000	上调
		Cluster-48701.4	10.371 760 000	上调
		Cluster-48701.5	2.676 438 000	上调
		Cluster-48701.6	10.366 390 000	上调
		Cluster-48701.7	10.178 620 000	上调
<i>F3H</i>	K00475	Cluster-36447.0	6.548 214 000	上调
		Cluster-36447.1	4.928 480 000	上调
		Cluster-36447.2	6.387 560 000	上调
<i>F3'HK</i>	K05280	Cluster-32997.0	6.772 318 000	上调
<i>FLS</i>	K05278	Cluster-41814.0	3.965 308 000	上调
		Cluster-46169.0	5.286 667 000	上调
		Cluster-2409.8	2.216 758 000	上调
		Cluster-45575.0	-1.511 980 000	下调
<i>LAR</i>	K13081	Cluster-42153.0	6.912 319 000	上调
<i>ANR</i>	K08695	Cluster-43505.0	4.661 731 000	上调
		Cluster-32078.0	-3.649 090 000	下调
		Cluster-41002.0	1.213 669 000	上调
		Cluster-41002.1	1.962 991 000	上调

但其生物合成途径和相关酶基因相对保守,并已经被阐述得较为清晰。黄酮类成分由苯丙烷类化合物和聚酮类化合物途径合成^[22],是一种包含 10 000 多结构的次生代谢物,广泛存在于植物界当中^[23]。 $C4H$ 是多酚类化合物苯丙烷代谢途径中的关键酶,其作用是将苯丙氨酸催化成香豆素酸,香豆酸再经过 $4CL$ 催化,进一步生成香豆酰辅酶 A。研究表明,植物种黄酮类化合物、木质素、芳香族类化合物合成等多条代谢途径会随着 $C4H$ 蛋白质活性和转录丰度的变化而发生变化^[24]。作为黄酮类成分合成途径上的第 1 个关键酶, CHS 催化生成柚皮素查耳酮,并进一步生成各类黄酮类化合物,其表达水平与植物黄酮类化合物含量密切相关^[25-26]。 CHI 是植物中柚皮素查耳酮分子内环化生成柚皮素必需的酶,是黄酮类成分生物合成途径上的第 2 个关键酶^[27-28], CHI 过表达可增加拟南芥中黄酮醇的积累^[29],并刺激黄芪中芹菜素的积累^[30],而在本研究中芹菜素的含量上升,可能为正向调控的结果。 $F3H$ 基因是黄酮类化合物生物合成途径中一个不可或缺的基因^[31],是整个类黄酮代谢途径的中枢,在一定程度上作为分流节点调控着黄酮醇的形成和花青素苷的积累^[32]。在覆盆子黄酮合成途径(图 13)中, $F3H$ 基因催化合成二氢山柰酚,然后在 $F3H$ 的作用下形成黄酮醇类,如山柰酚、槲皮素,并经过 LAR 等酶的联合作用合成花色素。 $F3'H$ 与 $F3',5'H$ 归类为细胞色素 P450 类,类黄酮 B 环的羟基化由 $F3'H$ 和 $F3',5'H$ 催化完成,二者也属于黄酮类成分生物合成途径上的关键酶。黄酮类化合物除了在 CHS 、 CHI 、 $F3H$ 、 $F3'H$ 和 $F3',5'H$ 的调控下合成,还需要 FLS 、 DFR 、 ANS 、 ANR 、 UDP -葡萄糖基转移酶(UGT)以及其他修饰酶在内的一组复杂的多个酶体系的协助。

综上所述,本研究构建了覆盆子 5 个不同时期果实的转录组和代谢组,研究了覆盆子中黄酮类化合物在不同生长时期中的含量差异,发现山柰酚-3- O -芸香糖苷、芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3- O -葡萄糖酸苷、槲皮苷在 S5 时期含量较高,其中标志性有效成分山柰酚-3- O -芸香糖苷在 S2 时期中含量急剧下降,香橙素、芹菜素和紫云英苷在 S1 中表达量较高;槲皮素、山柰酚和圣草酚在 S2 中表达含量较高;花旗松素和木犀草素在 S3 中表达含量较高;紫云英苷、柚皮素、根皮素、根皮苷和乔松素在 S4 中表达含量较高。通过转录组和代谢组的关联分析

挖掘出调控覆盆子果实黄酮类化合物生物合成的关键基因,并解析黄酮类化合物积累可能的调控机制,其中 CHS 基因表达上调可增强根皮素、乔松素查耳酮、异甘草素和柚皮素查耳酮等中间产物的合成, CHI 基因具有催化作用,促进柚皮素、甘草素、乔松素等下游黄酮类物质的积累。 FLS 可催化生成山柰酚-3- O -芸香糖苷的前体物质山柰酚的关键基因,也可以催化二氢槲皮素生成槲皮素,继而生成金丝桃苷和芦丁等覆盆子中重要的黄酮类物质。 $F3'H$ 和 $F3',5'H$ 可催化生成圣草酚、木犀草素和二氢槲皮素等物质。本研究为覆盆子果实的采摘时间提供了依据,为药用部位黄酮类成分的利用提供了支撑,为后期进一步解析其生物合成途径和调控机制奠定基础。覆盆子黄酮类生物合成的关键基因在其生长过程中具有复杂的调控作用,其网络调控还有待于进一步的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sheng J Y, Wang S Q, Liu K H, et al. *Rubus chingii* Hu: An overview of botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 401-416.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 58.
- [3] 何佳, 周越美, 赵智慧, 等. 不同加工方法与贮存时间对覆盆子含量测定指标的影响 [J]. *医药导报*, 2022, 41(5): 693-697.
- [4] 施江南, 温乐乐, 江丽洁, 等. 基于文献计量学的覆盆子研究热点与趋势分析 [J]. *中草药*, 2025, 56(2): 598-616.
- [5] 肖洪明, 祖灵博, 李石平, 等. 掌叶覆盆子化学成分的研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2011, 21(3): 220-226.
- [6] Yu G H, Luo Z Q, Wang W B, et al. *Rubus chingii* Hu: A review of the phytochemistry and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 799.
- [7] 郭启雷. 掌叶覆盆子及羊耳菊的化学成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2005.
- [8] 王静宜, 余俊东, 陈悦, 等. 覆盆子的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(13): 3897-3903.
- [9] Han N, Gu Y H, Ye C, et al. Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*) [J]. *Food Chem*, 2012, 132(1): 181-185.
- [10] 师聪, 解春芝, 张建萍, 等. 覆盆子不同极性溶剂提取物的抗氧化活性比较 [J]. *食品科技*, 2021, 46(1): 220-224.
- [11] 陈青, 王玉珠, 梁延群, 等. 干燥方式对树莓总酚、总

- 黄酮含量及其体外抗氧化活性的影响 [J]. 北方园艺, 2019(13): 130-134.
- [12] 于强, 杨敏, 潘萍, 等. 基于广泛靶向代谢组学技术的掌叶覆盆子不同部位代谢产物差异分析 [J]. 食品科学, 2025, 47(35): 1-24.
- [13] Hua Y J, Dai B Y, Luo Y Y, *et al.* Integrated analysis of multiple metabolome and transcriptome revealed the accumulation of flavonoids and associated molecular regulation mechanisms in *Rubus chingii* Hu at different developmental stages [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2023, 204: 108085.
- [14] Chen Z, Jiang J Y, Shu L Z, *et al.* Combined transcriptomic and metabolic analyses reveal potential mechanism for fruit development and quality control of Chinese raspberry (*Rubus chingii* Hu) [J]. *Plant Cell Rep*, 2021, 40(10): 1923-1946.
- [15] Li X B, Jiang J Y, Chen Z, *et al.* Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of flavonoid biosynthesis during fruit maturation in *Rubus chingii* Hu [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 706667.
- [16] Fraga C G, Clowers B H, Moore R J, *et al.* Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(10): 4165-4173.
- [17] Thévenot E A, Roux A, Xu Y, *et al.* Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3322-3335.
- [18] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. *Genome Res*, 1997, 7(10): 986-995.
- [19] 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.
- [20] 卜红宇, 韩峰, 郝美玲, 等. 药用植物类黄酮生物合成调控的研究进展 [J]. 北方药学, 2021, 18(7): 192-196.
- [21] 吕亮雨, 段国珍, 李发毅, 等. 微生物菌剂对枸杞生长及土壤养分的影响 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(1): 168-175.
- [22] Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, *et al.* The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 72: 21-34.
- [23] Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, *et al.* Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2): 3540-3555.
- [24] 刘宽亮, 赵志常, 高爱平, 等. 芒果 *C4H* 基因的克隆及其表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 8-12.
- [25] Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution [J]. *BioEssays*, 1994, 16(2): 123-132.
- [26] Dick C A, Buenrostro J, Butler T, *et al.* Arctic mustard flower color polymorphism controlled by petal-specific downregulation at the threshold of the anthocyanin biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18230.
- [27] Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 943.
- [28] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of *Chalcone* isomerase gene [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6074-6078.
- [29] Jiang W B, Yin Q G, Wu R R, *et al.* Role of a *Chalcone* isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(22): 7165-7179.
- [30] Elarabi N I, Abdelhadi A A, Sief-Eldein A G M, *et al.* Overexpression of *Chalcone* isomerase A gene in *Astragalus trigonus* for stimulating apigenin [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 24176.
- [31] Baek M H, Chung B Y, Kim J H, *et al.* Molecular cloning and characterisation of the flavanone-3-hydroxylase gene from Korean black raspberry [J]. *J Hortic Sci Biotechnol*, 2008, 83(5): 595-602.
- [32] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083.

[责任编辑 时圣明]