



基于代谢组学和转录组学解析不同品系黄果枸杞黄酮类化合物积累机理

包雪梅, 罗琼, 宗渊

引用本文:

包雪梅, 罗琼, 宗渊. 基于代谢组学和转录组学解析不同品系黄果枸杞黄酮类化合物积累机理[J]. 热带亚热带植物学报, 2026, 34(4): 427–436.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.5048>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

升振山姜茎的黄酮类成分

Flavonoids from the Stems of *Alpinia hainanensis* 'Shengzhen'

热带亚热带植物学报. 2017, 25(5): 517–522 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3736>

Zn、B配施对鸡血藤黄酮类化合物积累的影响

Effect of Zn,B Fertilization on Flavonoids Accumulation in *Spatholobus suberectus* Dunn.

热带亚热带植物学报. 2018, 26(1): 73–78 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3775>

木槿的化学成分研究

Chemical Constituents from the Stems of *Hibiscus syriacus*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 331–338 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4288>

喙果皂帽花根的化学成分研究

Chemical Constituents from the Roots of *Dasymaschalon rostratum*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(2): 202–206 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3830>

降香檀叶的非黄酮类成分研究

Non-flavonoid Constituents from the Leaves of *Dalbergia odorifera*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(2): 213–218 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3941>

向下翻页, 浏览PDF全文

基于代谢组学和转录组学解析不同品系黄果枸杞黄酮类化合物积累机理

包雪梅¹, 罗琼¹, 宗渊^{2,3*}

(1. 青海师范大学生命科学学院, 西宁 810008; 2. 香港浸会大学中医药学院, 香港 999077; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要: 为探讨黄果枸杞(*Lycium barbarum* var. *auranticarpum*)黄酮类化合物生物合成的调控网络, 利用广泛靶向代谢组学技术和转录组学分析黄果枸杞和杂交黄果枸杞的差异代谢物和差异表达基因。结果表明, 55 种黄酮类化合物在杂交黄果枸杞果实中含量较高, 其中黄酮醇(63 种)和二氢黄酮(13 种)类化合物占主导(60.09%)。通过筛选黄酮类化合物生物合成相关途径差异代谢物表明, 肉桂酸、圣草素和二氢槲皮素等化合物在杂交黄果枸杞中含量较高, 而槲皮素和表儿茶素仅在杂交黄果枸杞中存在。黄果枸杞和杂交黄果枸杞中共检测到 23 244 个基因差异表达, 14 129 个基因在杂交黄果枸杞中表达上调, 9 115 个基因下调。筛选出黄酮类化合物生物合成相关途径差异表达结构基因 11 条, 杂交黄果枸杞中共有 7 个参与黄酮类化合物生物合成的关键结构基因(*LbANS*、*LbF3'H*、*LbF3'5'H*、*Lb4CL*、*LbDFR*、*LbPAL* 和 *LbFLS*)的表达量均高于黄果枸杞。同时, 4 条 MYB 转录因子在杂交黄果枸杞中表达上调。因此, 这些关键结构基因和转录因子可能是调控黄果枸杞和杂交黄果枸杞黄酮代谢物差异积累的关键基因。

关键词: 黄果枸杞; 代谢组学; 转录组学; 黄酮类化合物; 调控机制; 转录因子

doi: 10.11926/jtsb.5048 CSTR:32235.14.jtsb.5048

Mechanism Analysis of Flavonoid Accumulation in Different Strains of Yellow Goji Based on Metabolomics and Transcriptomics

BAO Xuemei¹, LUO Qiong¹, ZONG Yuan^{2,3*}

(1. College of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, China; 3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: To explore the regulatory network of flavonoid biosynthesis in *Lycium barbarum* var. *auranticarpum*, we utilized broad-target metabolomics and transcriptomics to analyze the differential metabolites and differentially expressed genes between *L. barbarum* var. *auranticarpum* (yellow goji) and its hybrid (hybrid yellow goji). The results showed that 55 kinds of flavonoids were present in higher amounts in the fruits of hybrid yellow goji, among which flavonols (63) and dihydroflavones (13) were dominant (60.09%). By screening the differential metabolites in the flavonoid biosynthesis-related pathways, it was found that cinnamic acid, swertiamarin and dihydroquercetin were present in higher amounts in hybrid yellow goji, while quercetin and epicatechin were only present in hybrid yellow goji. A total of 23 244 differentially expressed genes were detected in yellow goji and hybrid yellow goji, with 14 129 genes upregulated and 9 115 genes downregulated in hybrid yellow goji. Eleven differentially expressed structural genes related to the flavonoid biosynthesis pathway were screened out. The expression of seven key structural genes (*LbANS*, *LbF3'H*, *LbF3'5'H*, *Lb4CL*, *LbDFR*, *LbPAL*

收稿日期: 2025-07-18 接受日期: 2025-08-29

基金项目: 青海省基础 Research 计划项目(2024-ZJ-972)资助

This work was supported by the Program for Basic Research Planning in Qinghai (Grant No. 2024-ZJ-972).

作者简介: 包雪梅(1991 年生), 女, 博士, 副教授, 研究方向为分子植物育种。E-mail: baoxuemei1991@163.com

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: zongyuan@hkbu.edu.hk

and *LbFLS*) involved in flavonoid biosynthesis were all higher in hybrid yellow goji than in yellow goji. Meanwhile, four MYB transcription factors were upregulated in hybrid yellow goji. Therefore, these key structural genes and transcription factors may be the key genes regulating the differential accumulation of flavonoids in yellow goji and hybrid yellow goji.

Key words: *Lycium barbarum* var. *auranticarpum*; Metabolomics; Transcriptomics; Flavonoids; Regulatory mechanism; Transcription factor

黄果枸杞(*Lycium barbarum* var. *auranticarpum*)是茄科(Solanaceae)枸杞属多年生灌木^[1-2],是宁夏枸杞的变种^[3]。其果实呈卵圆状、果皮呈黄色、色泽鲜亮、果皮薄、出汁率高、口感细腻^[3-6],与红果枸杞(宁杞 1 号)相比,黄果枸杞富含枸杞多糖、黄酮、类胡萝卜素等营养成分,总黄酮含量较红果枸杞(宁杞 1 号)更高^[5],具有可观的市场前景和经济价值,可满足消费者的多样性需求,也是枸杞种质资源中的稀缺材料。杂交黄果枸杞(青杂 1 号)是以黑果枸杞(*L. ruthenicum*)为父本,宁夏枸杞(*L. barbarum*)为母本进行人工杂交选育而成,其果实呈圆形,亮黄色。

黄酮类化合物是具有 C6 (A 环)-C3 (C 环)-C6 (B 环)的碳骨架结构的天然多酚类化合物,根据结构差异可分为黄烷酮类(如柚皮素、橙皮素)、黄酮类(如芹菜素、木犀草素)、异黄酮类(如染料木黄酮、大豆黄酮)、黄酮醇类(如槲皮素、山奈酚)、黄烷醇类(儿茶素)和花青素类^[7-9]。这类化合物具有抗氧化^[10-11]、预防心血管疾病^[12-13]、抗炎^[2,14-15]、抗癌^[16-17]和抗病毒^[18]等多种药理活性,在功能食品和医药领域应用广泛。

黄酮类化合物的生物合成是通过苯丙烷途径完成的^[19],其关键结构基因包括苯丙氨酸氨解酶(*PAL*)、肉桂酸 4-羟化酶(*C4H*)、4-香豆酸: CoA 连接酶(*4CL*)、查尔酮合成酶(*CHS*)、查尔酮异构酶(*CHI*)、黄酮 3-羟化酶(*F3H*)、黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)和黄酮醇合成酶(*FLS*)等^[9,20]。该途径调控网络受环境因子(光照、温度)、植物激素(茉莉酸、脱落酸)和转录因子(如 MYB、bHLH、WD40)的协同调控^[21-23]。MYB、bHLH 和 WD40 组成的 MBW 复合物是黄酮类生物合成的主要转录调控因子^[23-24]。在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中, SIMYC2-MED25 复合物通过直接调节 *SIMYB12* 基因的表达影响果实中类黄酮的积累^[25]。在泡核桃(*Juglans sigillata*)中, *JsMYB141* 通过调控 *JsPAL*、*JsCHS*、*JsF3'5'H* 和 *JsFLS* 的转录水平正向调控杨梅素、芦丁的含量,

JsMYB170 通过调控 *JsCHS*、*JsCHI* 和 *JsFLS* 的转录水平正向调控山奈酚、槲皮素和芦丁的含量^[26]。在白杨(*Populus alba*)中, *PabHLH1* 和 *PaMYB90* 共同表达不仅促进了花青素的合成,而且提高了中间产物槲皮素和山奈酚的含量^[27]。

代谢组学技术(LC-MS/GC-MS)与转录组学的联合分析已成为解决植物次生代谢调控网络的重要工具。近年来,代谢组和转录组联合分析广泛应用于解析不同生长阶段、不同表型、不同组织部位和不同种质资源次生代谢物的代谢特征及其相关基因调控网络。Tian 等^[28]对成熟蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)果实的外果皮、果肉和种子进行了代谢组转录组联合分析表明,飞燕草素-3,5-二葡萄糖苷、飞燕草素-3-*O*-芸香糖苷和飞燕草素-3-*O*-槐糖苷是蓝莓果实中的核心差异代谢物,14 个结构基因和 10 个转录因子可能调控蓝莓果实花青素的生物合成。Du 等^[29]通过比较不同产地黑果枸杞药用活性及其代谢构成,认为青海黑果枸杞富含更高水平的黄酮类代谢物,尤其是山奈酚-3-*O*-芸香糖苷和芦丁, *LrCYP75B1*、*LrFLS*、*LrF3H* 和 *LrCHS* 等是调控黑果枸杞黄酮类化合物合成的关键候选基因。在金花茶(*Camellia nitidissima*)黄色花发育过程中,黄酮醇和黄酮的大量积累促进了金花茶黄色花的形成, *CpFLS*、*CpCHI*、*CpF3H*、*CpF3'H*、*CpDFR* 和 *CpANS* 可能在金花茶黄酮类生物合成调控网络中发挥核心作用^[30]。

目前,关于黄果枸杞和杂交黄果枸杞果实黄酮差异积累的分子调控机制尚不明确。因此,本研究基于广泛靶向代谢组学和转录组学,探究 2 种枸杞果实黄酮类化合物代谢相关的物质基础和分子遗传机理,阐明黄色果实形成的关键差异代谢物,并筛选出可能调控黄酮类化合物生物合成的关键结构基因和转录因子。本研究有助于系统解析黄果枸杞果实黄酮类化合物生物合成的分子转录调控机制,并为后续基因功能验证提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验选用的黄果枸杞(Yellow)和杂交黄果枸杞(Yellowhyb, 青杂1号)成熟果实, 于2022年9月初采摘于青海省德令哈市怀头他拉镇(96°75.1173' E, 37°34.9636' N), 海拔2 872 m。果实采摘后立即用液氮处理, 于-80 °C冰箱中保存, 用于代谢物和转录组分析。甲醇、乙腈为色谱纯, 均购自美国 Merck 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

采集的枸杞果实样品在冻干机(Scientz-100F)中进行真空冷冻干燥后, 用研磨仪(MM 400, Retsch)将果实研磨至粉末状, 取1.20 mL 70%甲醇溶解100.00 mg 样品粉末, 样品涡旋6次(每次30 s, 每30 min 涡旋1次)后置于4 °C冰箱。最后, 对提取液进行离心(1 600×g, 10 min), 吸取上清液用0.22 μm 滤膜过滤后用于UPLC-MS/MS分析。

1.2.2 色谱质谱条件

本研究采用超高效液相色谱(SHIMADZU Nexera X2)和串联质谱(Applied Biosystems 4500 QTRAP)进行数据采集, 委托武汉迈特维尔生物科技有限公司完成。色谱条件: 色谱柱选择 Agilent SB-C18 (100 mm×2.1 mm i.d., 1.8 μm); 流动相A相为加入含0.1%甲酸的超纯水(V/V), 流动相B相为加入含0.1%甲酸的乙腈(V/V)。流速为0.35 mL/min; 柱温为40 °C; 进样量为4 μL。具体的梯度洗脱程序见表1。

表1 UPLC 梯度洗脱程序

Table 1 UPLC gradient elution program

时间 Time (min)	水 Water	乙腈 Acetonitrile
0	95	5
9	5	95
10	5	95
11.10	95	5
14	95	5

质谱条件: 选择正负离子扫描模式。ESI 源具体参数如下: 离子喷雾电压(IS)为5 500 V (正离子模式)/-4 500 V (负离子模式); 离子源气体I (GSI)、气体II (GSII)和气帘气(CUR)分别设置为50、60和25 psi。在QQQ和LIT模式下分别用10和100 μmol/L 聚丙

二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。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。

1.2.3 代谢物定性定量分析

代谢物定性分析基于自建数据库 MWDB (MetWare Database)的二级谱(MS/MS)信息进行匹配。结合保留时间(RT)和质荷比(m/z)对化合物进行鉴定。代谢物定量分析是利用三重四级杆质谱(Triple Quadrupole MS)的多反应监测模式(MRM), 通过分析特征离子对实现目标化合物的准确定量。数据处理包括对所有物质质谱峰进行峰面积积分; 采用质量控制(QC)样本对同一代谢物在不同样本中的相应强度进行校正; 使用内标法进一步校正数据, 提高定量准确性。

1.2.4 转录组测序及差异基因表达分析

使用总RNA提取试剂盒(DP441)提取黄果枸杞和杂交黄果枸杞总RNA, 总RNA质量采用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测(200 V, 250 mA, 10 min), Nanodrop (Thermo)测定浓度。武汉迈维代谢生物科技股份有限公司进行cDNA文库构建并利用Illumina NovaSeq 6000仪器进行cDNA文库测序, 产生150 bp 配对末端读数。利用Trimmomatic软件对原始数据进行过滤, 去除低质量的reads, 保证了数据的准确性和可靠性。利用Trinity (v2.6.6)软件, 对获得的高质量clean reads进行合并组装, 获得较为可靠的转录本, 用于后续的差异分析。使用BLAST将拼接组装得到的Unigene在非冗余蛋白质数据库(Nr)、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)、GO (<http://www.geneontology.org/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、蛋白质序列数据库(SwissProt)和真核生物蛋白相邻类的聚簇(KOG)等公共数据库中进行功能注释和比对($e < 1e-5$)。采用DESeq2软件^[31]对黄果枸杞和杂交黄果枸杞果实差异表达基因进行卡方分析, 以确定差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 错误发现率FDR≤0.05且 $|\log_2FC(\text{FoldChange})| \geq 1$ 的Unigenes判定为显著差异表达基因。

1.2.5 代谢组和转录组联合分析

基于前期黄酮类化合物合成代谢通路差异基因与差异代谢物的筛选结果, 绘制代谢通路图, 进一步分析基因和代谢物之间的关联。质谱数据利用Analyst 1.6.3软件进行处理; 基于R软件平台的prcomp函数进行主成分分析; 利用ComplexHeatmap

包进行层次聚类分析；并采用 OPLSR.Anal 进行偏最小二乘判别分析。差异筛选标准设定为：对于代谢物，若 $|\log_2FC(\text{Fold Change})| \geq 2$ 且 $VIP \geq 1$ ，或 $|\log_2FC| \leq 0.5$ ，则认定为显著差异代谢物；对于基因，若 $FDR \leq 0.05$ 且 $|\log_2FC| \geq 1$ ，则判定为显著差异表达基因。

2 结果和分析

2.1 代谢组学分析

2.1.1 差异代谢物筛选分析

黄果枸杞和杂交黄果枸杞果实表型如图 1: A 所示，通过与 MWDB 数据库进行对比分析确定了代谢产物的结构，2 种枸杞共鉴定出 11 类 925 种代谢产物，其中黄酮类代谢产物数量最多，达到 171 种，占总代谢物的 18.49%，其次是酚酸类化合物，共 152 种，占比 16.43% (图 1: B)。根据 $FC \geq 2$ 和 $FC \leq 0.5$ 且 $VIP \geq 1$ 的条件筛选差异显著的代谢物，代谢物在 2 种枸杞果实中存在差异，共有 487 种差异代谢物，相较于杂交黄果枸杞，黄果枸杞果实中 266 种差异代谢物含量较高，221 种差异代谢物含量较低。

2.1.2 黄酮类差异积累代谢物分析

本研究利用广泛靶向代谢组学共检测到 11 类 487 种差异代谢物，其中黄酮类化合物差异最为显著，共鉴定出 115 种(占 23.61%)，包括 60 种(52.17%)在黄果枸杞果实中显著富集的黄酮类物质。差异黄酮可进一步分为黄酮醇、二氢黄酮、黄酮和二氢黄酮醇等 9 个亚类，其中黄酮醇与二氢黄酮合计占比达 60.09% (表 2)。代谢物差异分析表明，黄果枸杞中奥卡宁-4'-O-葡萄糖苷($\text{Log}_2FC=11.12$)、山奈酚-3-O-半乳糖苷(三叶豆苷)($\text{Log}_2FC=11.19$)、槲皮素-3-O-桑布双糖苷($\text{Log}_2FC=11.23$)和槲皮素-3-O-(2''-O-对香豆酰)槐糖苷-7-O-葡萄糖苷($\text{Log}_2FC=12.00$)等黄酮类化合物含量显著高于杂交黄果枸杞；而杂交黄果枸杞中牵牛花素-3-O-(6''-O-对香豆酰)芸香糖苷-5-O-葡萄糖苷-4'-O-葡萄糖苷($\text{Log}_2FC=-12.85$)和异鼠李素-3-O-半乳糖苷-7-O-鼠李糖苷($\text{Log}_2FC=-12.06$)等黄酮类含量则显著高于黄果枸杞(图 2)。此外，酚酸类代谢物差异也较为显著，共检测到 74 种(占 15.20%)。

2.1.3 差异代谢物通路分析

对差异代谢物进行 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)富集分析，共鉴定出 312 种差异显著的代谢物，主要富集在 20 条代谢途径中，以

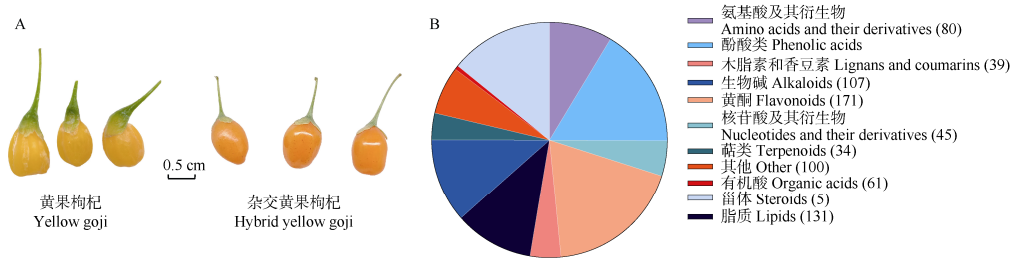


图 1 2 种枸杞果实表型(A)和差异代谢物分布(B)

Fig. 1 Phenotypes (A) and differential metabolite distributions (B) of the two goji fruits

表 2 黄酮差异代谢物数量统计

Table 2 Statistics on the number of differential flavonoid metabolites

类型 Type	总数 Number	上调 Up	下调 Down
查耳酮 Chalcone	9	4	5
二氢黄酮 Dihydroflavone	13	5	8
二氢黄酮醇 Dihydroflavonol	8	4	4
花青素 Anthocyanidin	1	0	1
黄酮 Flavonoid	11	8	3
黄酮醇 Flavonol	63	36	27
黄酮碳糖苷 Flavonoid C-glycoside	2	1	1
黄烷醇类 Flavanols	7	1	6
橙酮类 Aurones	1	1	0
合计 Total	115	60	55

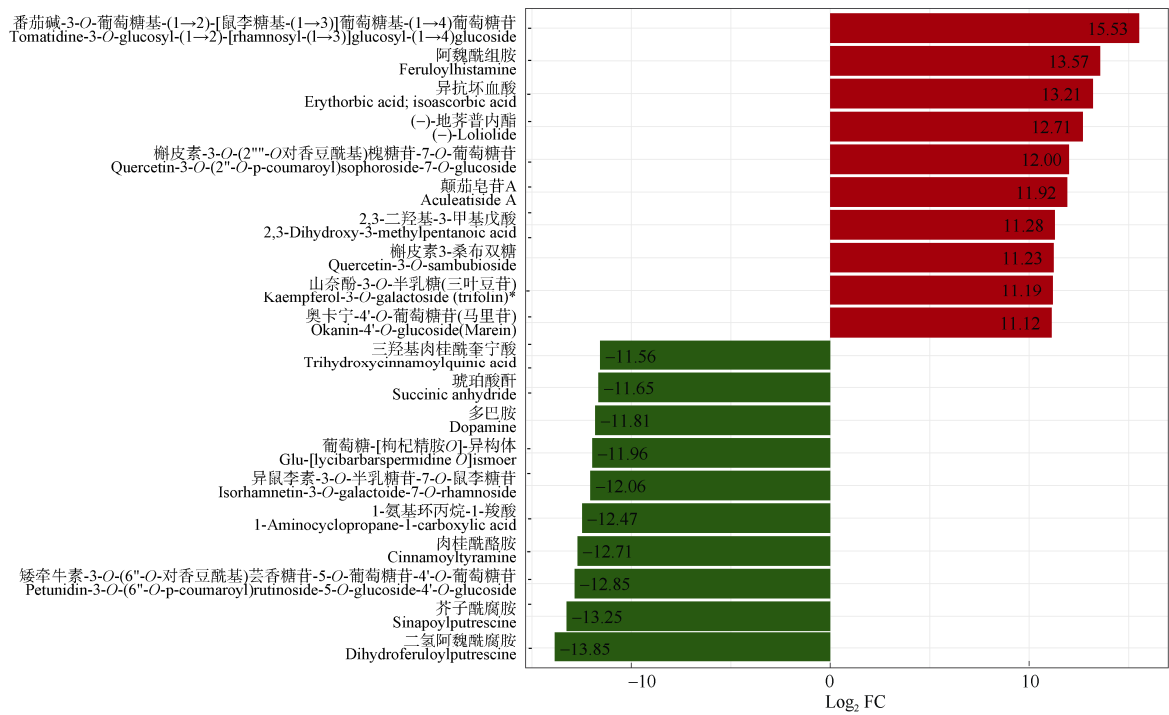


图 2 代谢物含量差异动态分布图

Fig. 2 Dynamic distribution of metabolite content differences

$P < 0.01$ 为阈值筛选显著富集通路, P 越接近于 0, 表示富集越显著。差异代谢物 KEGG 富集图见图 3, 差异代谢物富集比较显著的通路分别是次级代谢产物的生物合成(ko01110)、苯丙烷生物合成(ko00940)和类黄酮生物合成(ko00941)。

2.2 转录组学分析

2.2.1 序列组装及蛋白注释

采用 Illumina NovaSeq 6000 高通量测序平台对黄果枸杞和杂交黄果枸杞果实的 cDNA 文库进行转录组测序, 测得 45 937 882 和 40 949 267 个 Raw Reads, 过滤后分别产生了 41 073 465 和 40 368 818 个 Clean Reads, Q20 (碱基质量值 $\geq 20\%$) 为 95.79% 和 97.72%, Q30 (碱基质量值 $\geq 30\%$) 为 89.98% 和 93.55%, GC 含量分别为 40.36% 和 41.57%。结果表明该测序质控较好, Clean Reads 质量合格, 测序数据可靠, 可用于后续的转录组分析。

利用 KEGG、Nr、SwissProt、KOG、Pfam 和 GO 等蛋白数据库对所有 Unigenes 进行了蛋白质预测, 结果见表 3。分别预测了 50 067 (31.06%)、71 243 (44.20%)、44 068 (27.34%)、37 928 (23.53%)、54 417 (33.76%) 和 41 196 (22.56%) 个蛋白质。对预测蛋白进行同源比对, 分别与马铃薯(*Solanum tuberosum*, 19.33%)、渐狭叶烟草(*Nicotiana attenuata*, 12.62%)

表 3 基因功能注释统计

Table 3 Summary statistics of function annotation for unigenes			
数据库 Database	数量 Number	%	
KEGG	50 067	31.06	
Nr	71 243	44.20	
SwissProt	44 068	27.34	
KOG	37 928	23.53	
GO	54 417	33.76	
Pfam	41 196	25.56	
Annotated in at least one Database	74 026	45.93	
Total Unigenes	161 184	100.00	

和辣椒(*Capsicum annuum*, 11.86%)等同源(图 4)。

2.2.2 差异表达基因功能分析

共有 23 244 个基因在黄果枸杞和杂交黄果枸杞中差异表达, 以黄果枸杞为参照, 有 14 129 个基因上调(在杂交黄果枸杞中表达水平较高), 9 115 个基因下调(在黄果枸杞中表达水平较高), 31 047 个基因表达无差异(图 5: A)。KEGG 通路注释分析结果表明, 差异基因显著富集在代谢途径(ko01100)、次生代谢产物的生物合成(ko01110)等途径。其中, 80 个 unigenes 被注释到类黄酮合成途径、9 个 unigenes 被注释到黄酮和黄酮醇的生物合成途径及 8 个 unigenes 被注释到异黄酮生物合成途径(图 5: B)。

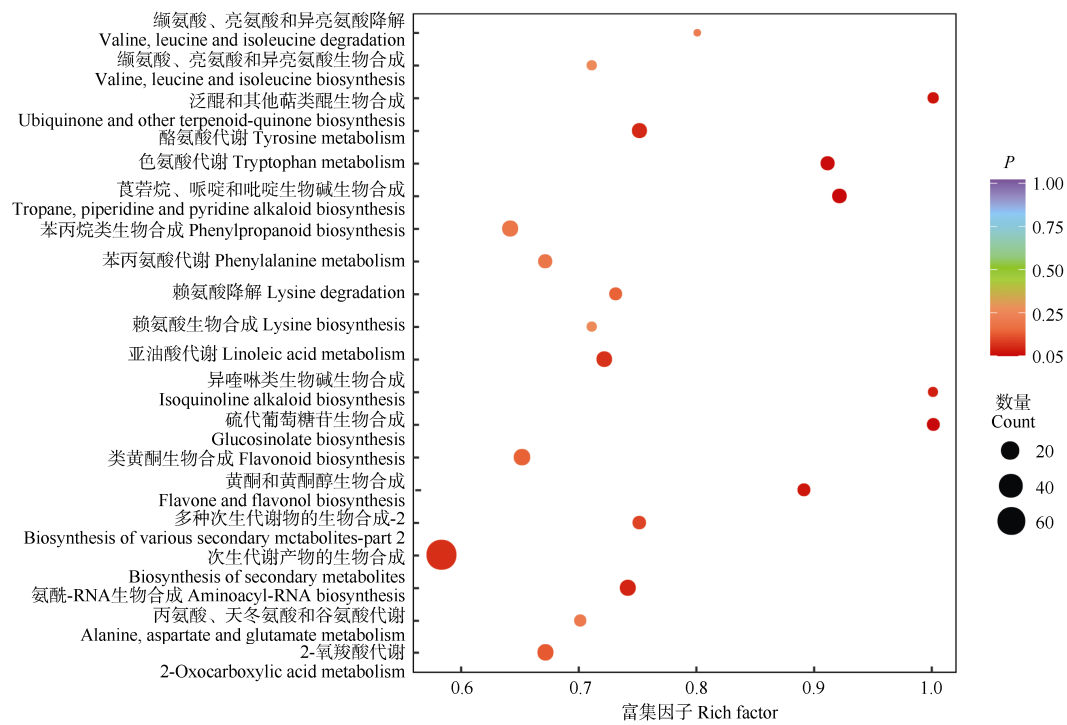


图 3 差异基因的 KEGG 通路统计

Fig. 3 KEGG classifications of differentially expressed unigenes

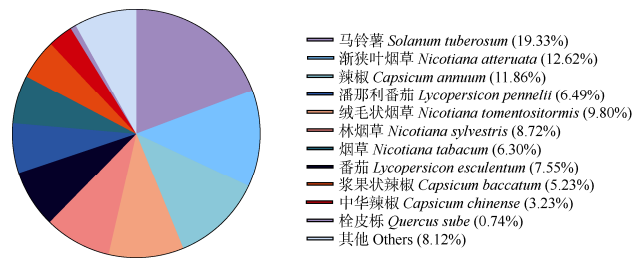


图 4 预测蛋白同源物种分布

Fig. 4 Homologous species distributions of the predicted protein

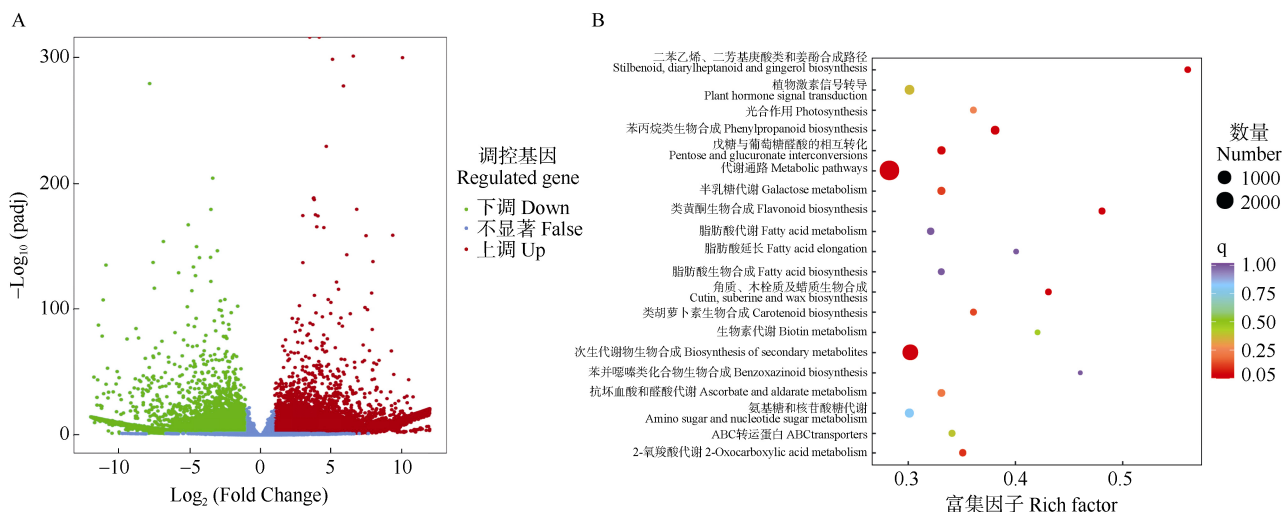


图 5 差异表达基因(A)和 KEGG 通路(B)

Fig. 5 Differential expression genes (A) and KEGG pathway (B)

2.2.3 黄酮合成代谢途径的基因表达

为进一步探究类黄酮生物合成通路的调控机制,本研究筛选出 11 个差异表达的结构基因(表 4)。与黄果枸杞相比,杂交黄果枸杞中多个基因表达显著上调。其中, *LbANS* 的上调幅度最高(648.83 倍),

其次是 *LbF3'H*、*LbF3'5'H*、*Lb4CL*、*LbDFR* 和 *LbPAL*, 上调倍数为 2.64~10.55 倍。值得注意的是, *LbFLS* 仅在杂交种中检测到表达。这表明, 杂交黄果枸杞的高黄酮含量可能源于该通路关键结构基因的激活与协同上调表达。

表 4 黄酮合成相关的差异表达基因

Table 4 Differential expression genes related to flavonoid synthesis

基因 Gene	基因 ID Gene ID	KEGG	平均表达量 Average expression		Log ₂ FC	上/下调 Up/down	倍数 Multiple
			黄果枸杞 Yellow goji	杂交黄果枸杞 Hybrid yellow goji			
PAL	Cluster-170.63027	K10775	635.18	1 678.95	1.579 357 689	up	2.64
C4H	Cluster-170.64400	K00487	243.53	80.68	-1.587 246 578	down	0.33
4CL	Cluster-16604.0	K01904	0.47	2.12	2.333 415 341	up	5.54
	Cluster-16604.2	K01904	0.44	2.92	2.917 252 159	up	
CHS	Cluster-170.17306	K00660	92.10	32.86	-1.283 003 297	down	0.39
	Cluster-170.125416	K00660	0.00	2.72	8.631 902 603	up	
F3H	Cluster-170.21298	K00475	199.13	187.90	0.079 6409 82	-	0.94
F3'H	Cluster-170.19843	K05280	22.63	238.64	3.548 925 277	up	10.55
F3'5'H	Cluster-170.5317	K13083	1.48	12.15	3.264 679 827	up	8.20
FLS	Cluster-170.101225	K24028	0.00	3.34	8.581 433 783	up	
DFR	Cluster-170.102730	K13265	24.74	102.98	2.218 359 229	up	4.16
ANS	Cluster-170.121094	K05277	0.06	38.93	9.638 678 104	up	648.83
ANR	Cluster-170.126478	K08695	2.55	1.49	-0.611 830 024	-	0.58
LAR	Cluster-170.76065	K23050	26.80	12.91	-0.915 344 564	-	0.48
MYB114	Cluster-170.127145	K09422	0.16	15.99	5.790 389 214	up	102.06
MYB114-like	Cluster-170.78144	K09422	0.45	124.23	7.195 998 019	up	274.04
MYB75	Cluster-170.135278	K09422	0.00	3.40	8.490 077 413	up	
MYB1	Cluster-170.19101	K09422	0.00	7.48	9.681 581 746	up	
MYC2	Cluster-170.76138	K13422	18.57	5.29	-1.684 751 583	down	0.28
MYC2	Cluster-170.118650	K13422	2.40	9.89	2.172 544 453	up	4.13
MYC2	Cluster-170.16562	K13422	0.70	7.83	3.617 709 600	up	11.23

本研究共鉴定出 965 个转录因子 unigenes, 分属 78 个家族(如 AP2/ERF、MYB、bHLH、WRKY、NAC)。针对调控黄酮生物合成的 MYB 和 bHLH 转录因子进行深入分析, 共筛选到 4 个差异表达的 MYB 转录因子, 其中 *LbMYB114* 和 *LbMYB114-like* 在杂交黄果枸杞中上调 102.06/274.04 倍; *LbMYB75* 和 *LbMYB1* 仅在杂交种表达, 2 个 bHLH 转录因子 (*Cluster-170.118650* 和 *Cluster-170.16562*)也在杂交种中上调表达(上调 4.13/11.23 倍)。初步推测这 4 个 MYB 转录因子可能是调控杂交黄果枸杞黄酮生物合成的关键候选基因。

2.3 代谢组转录组学联合分析

为阐明黄果枸杞与杂交黄果枸杞果实中黄酮类化合物差异积累的分子机制, 本研究通过整合代谢组与转录组数据, 构建了黄酮类化合物生物合

成通路中差异代谢物与差异表达基因的调控网络(图 6)。代谢物分析表明, 黄果枸杞中根皮素(0.19)、柚皮素(0.20)和二氢山奈酚(0.78)等中间产物显著积累; 而杂交黄果枸杞中 L-苯丙氨酸(8.21)、肉桂酸(21.60)、圣草素(2.50)、二氢槲皮素(3.83)和表儿茶素(598.54)含量显著升高, 其中槲皮素和表儿茶素为杂交种特有代谢物。基因表达模式与上述代谢物积累高度吻合, 苯丙烷通路上游基因 *LbPAL* (2.04 倍)与 *Lb4CL* (5.54 倍)在杂交种中显著上调, 驱动 L-苯丙氨酸向肉桂酸的转化。黄酮核心合成基因 *LbF3'H* (10.85 倍)、*LbF3'5'H* (8.20 倍)和 *LbDFR* (4.16 倍)协同上调, 促进二氢槲皮素等中间产物合成, 终产物合成关键基因 *LbANS* 表达量极显著提升(648.83 倍), 直接导致表儿茶素在杂交种中超量积累(598.54 倍), *LbFLS* 仅在杂交种中特异性表达, 与槲皮素的

杂交种特异性检出一致。这表明杂交黄果枸杞中黄酮通路的系统性激活,源于 *LbPAL*、*Lb4CL*、*LbF3'H*、*LbF3'5'H*、*LbDFR*、*LbANS* 和 *LbFLS* 等结构基因

的协同上调表达,最终通过强化苯丙烷含量、定向富集槲皮素/表儿茶素,实现了黄酮类化合物的差异积累。

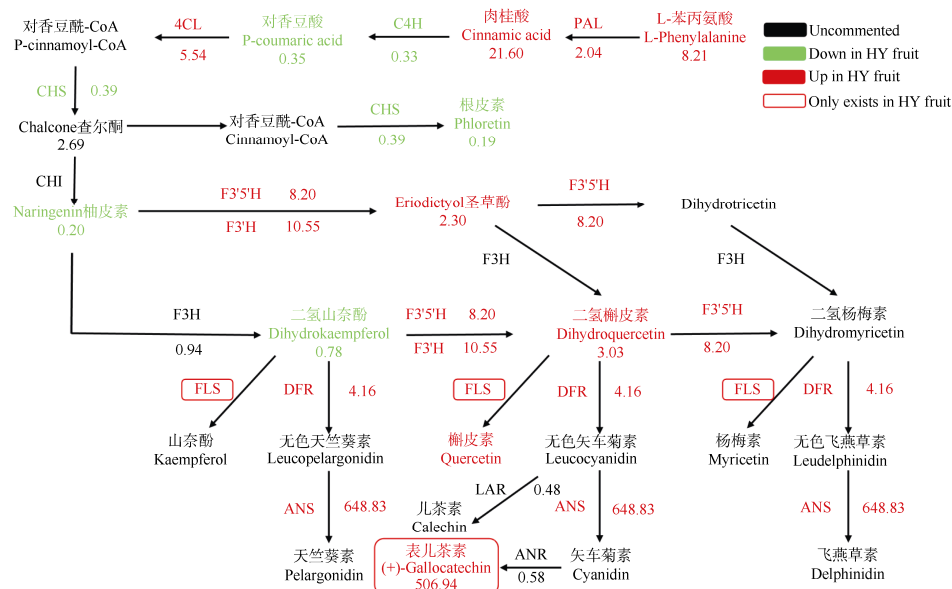


图 6 黄酮类化合物合成代谢途径

Fig. 6 Biosynthetic pathway of flavonoid compounds

3 讨论和结论

枸杞作为传统中药材和功能性食品,黄果种质因富含黄酮类化合物而具有独特价值。然而,相较于红果枸杞和黑果枸杞,黄果枸杞黄酮类化合物差异积累的分子机制尚不明确。本研究利用广泛靶向代谢组学和转录组学对黄果枸杞和杂交黄果枸杞果实的次生代谢物和差异表达基因进行分析,为解析黄果枸杞黄酮类化合物的生物合成分子遗传机理提供新见解。

3.1 黄果枸杞黄酮代谢特征与育种价值

本研究在黄果枸杞与杂交黄果枸杞中共鉴定到 925 种次生代谢物(黄酮类占比最高),杂交种黄酮多样性更丰富且组分显著分化。黄果枸杞中芦丁三水合物、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷-7-*O*-鼠李糖苷等槲皮素衍生物富集(Log₂FC=11.12~12.00),而杂交黄果枸杞中金合欢素-7-*O*-(6"-*O*-乙酰)葡萄糖苷、异鼠李素衍生物及活性成分(圣草素、表儿茶素、槲皮素)显著积累。该代谢谱差异提示杂交育种可定向优化黄酮组成,为高活性品种选育提供资源。

3.2 黄酮合成通路的结构基因调控机制

多组学联合分析揭示了杂交种黄酮高效合成

的分子基础,苯丙烷通路上调 *LbPAL* 和 *Lb4CL* 激活驱动肉桂酸积累。*CYP75* 亚家族基因 *LbF3'H* 和 *LbF3'5'H* 通过催化柚皮素/二氢山奈酚的 B 环 3'位羟基化,促进圣草素和二氢槲皮素合成。红肉马铃薯中 *F3'5'H* 基因的上调促进了圣草素和木犀草素的积累增加^[32]。周天山等^[33]通过操纵茶树类黄酮 *F3'H* 基因,生物合成 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物圣草素、二氢槲皮素和槲皮素。类黄酮分支通路也被特异性激活, *LbFLS* (仅在杂交种表达)竞争底物生成槲皮素,与槲皮素杂交种特异性检出一致。*FLS* 是以二氢黄酮醇为底物,催化黄酮结构中的 C3 位羟基化,进而生成杨梅素、山奈酚和槲皮素^[21]。苦荞(*Fagopyrum tataricum*) *FtFLS1* 的过表达促进了毛状根中山奈酚、槲皮素和芦丁的积累^[34]。金花茶 *CnFLS1* 在烟草中过量表达,促进了烟草中黄酮醇的积累,抑制了花青素的合成,烟草花呈现白色或浅黄色^[35]。此外, *LbANS* 极端上调导致终产物表儿茶素超量积累。上述 7 个结构基因(*LbPAL*、*Lb4CL*、*LbF3'H*、*LbF3'5'H*、*LbFLS*、*LbDFR* 和 *LbANS*)的协同表达模式,构成杂交种黄酮定向富集的核心因素。

3.3 转录因子对黄酮合成的分子调控

本研究鉴定出 4 个关键 MYB 转录因子和 2 个

bHLH 因子在杂交黄果枸杞中上调。MBW 复合物 (MYB-bHLH-WD40) 通过靶向 CHS、F3'H 等结构基因启动子调控黄酮类化合物的生物合成。茶树 (*Camellia sinensis*) bHLH 转录因子 (*CsGL3* 和 *CsTT8*) 与 MYB 转录因子 (*CsAN2* 和 *CsMYB5e*) 相互作用形成 MBW 复合物调节花青素、原花青素的合成代谢^[36]。参与草莓 (*Fragaria ananassa*) 类黄酮生物合成的 MBW 复合物 FaMYB5-FaEGL3-FaLWD1-like 靶向作用 *FaF3'H*、*FaLAR* 和 *FaAHA10* 的启动子, 促进类黄酮的积累^[37]。榴莲 (*Durio zibethinus*) *DzMYB1* 与 *DzbHLH1* 结合, 与 *DzCHS*、*DzCHI* 和 *DzF3H* 等结构基因的启动子相互作用调控黄酮类化合物的生物合成^[38]。因此, 本研究推测上述 MYB/bHLH 转录因子可能通过形成调控模块激活杂交黄果枸杞黄酮通路。

综上, 本研究综合比较了黄果枸杞和杂交黄果枸杞的转录组和代谢谱, 揭示了枸杞果实中 222 个类黄酮代谢产物和 23 244 个差异基因, 鉴定出了 11 个可能调控黄酮类化合物合成的 11 条差异表达结构基因、4 条 MYB 转录因子和 2 条 bHLH 转录因子。本研究结果为黄果枸杞黄酮类化合物的生物合成分子遗传机制及关键调控基因的功能鉴定提供了理论依据。

参考文献

- [1] LIANG X J, WANG Y J, AN W. Research progress on germplasm resources of yellow wolfberry [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2017, 58(8): 1376–1378. [梁晓婕, 王亚军, 安巍. 黄果枸杞种质资源的研究进展 [J]. 浙江农业科学, 2017, 58(8): 1376–1378. doi: 10.16178/j.issn.0528-9017.20170826.]
- [2] LAN T, DUAN G Z, QI Y C, et al. Exploration of chemical compositions in different germplasm wolfberry using UPLC-MS/MS and evaluation of the *in vitro* anti-inflammatory activity of quercetin [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1426944. doi: 10.3389/fphar.2024.1426944.
- [3] HU Y H. Isolation, purification, *in vitro* bioactivities and modulation of gut microbiota of (-)-5-*O*-(3-*O*- β -D-glucopyranosylcaffeoyl)-quinic acid from the fruits of *L. barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022. [胡宇航. 黄果枸杞(-)-5-*O*-(3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基咖啡酰)-奎尼酸分离纯化、体外活性与调节肠道菌群作用的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022. doi: 10.27244/d.cnki.gnjnu.2022.002424.]
- [4] LIANG X J, LI Y K, QIN X Y, et al. Comparison of quantitative characters and color differences of yellow wolfberry with different germplasm [J]. N Hort, 2022(1): 101–108. [梁晓婕, 李越鲲, 秦小雅, 等. 不同种质黄果枸杞数量性状及其颜色差异比较 [J]. 北方园艺, 2022(1): 101–108. doi: 10.11937/bfy.20213063.]
- [5] WANG Y J, GUO S J, AN W, et al. Study on the characters and major constituents in the fruits of five wolfberry varieties [J]. J For Environ, 2016, 36(3): 367–372. [王亚军, 郭素娟, 安巍, 等. 5 种枸杞的果实性状及主要营养成分 [J]. 森林与环境学报, 2016, 36(3): 367–372. doi: 10.13324/j.cnki.jfef.2016.03.019.]
- [6] HU Y H, KAN X H, YANG T T, et al. (-)-5-*O*-(3-*O*- β -D-glucopyranosylcaffeoyl)-quinic acid from the fruits of *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching: Purification, identification and *in vitro* bioactivities [J]. Food Chem, 2022, 389: 133081. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133081.
- [7] DIAS M C, PINTO D C G A, SILVA A M S. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity [J]. Molecules, 2021, 26(17): 5377. doi: 10.3390/molecules26175377.
- [8] LIGA S, PAUL C, PÉTER F. Flavonoids: Overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques [J]. Plants, 2023, 12(14): 2732. doi: 10.3390/plants12142732.
- [9] SONG Y T, ZHANG G Y, CHEN N, et al. Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into the flavonoid biosynthesis in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. LWT, 2023, 187: 115276. doi: 10.1016/j.lwt.2023.115276.
- [10] OLCHEVA V, BELOBORODOV V, SHARIFI S, et al. Dihydroquercetin and related flavonoids in antioxidant formulations with α -tocopherol [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(12): 5659. doi: 10.3390/ijms26125659.
- [11] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. Food Chem, 2022, 383: 132531. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531.
- [12] MATTIOLI R, FRANCIOSO A, MOSCA L, et al. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases [J]. Molecules, 2020, 25(17): 3809. doi: 10.3390/molecules25173809.
- [13] LIU Y X, LUO J, PENG L, et al. Flavonoids: Potential therapeutic agents for cardiovascular disease [J]. Heliyon, 2024, 10(12): e32563. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e32563.
- [14] MARTÍN M Á, RAMOS S. Impact of dietary flavanols on microbiota, immunity and inflammation in metabolic diseases [J]. Nutrients, 2021, 13(3): 850. doi: 10.3390/nu13030850.
- [15] GAO Z J, TANG D T, HE B F, et al. Prenylation of flavonoids by DMATS1 and their anti-inflammatory activities [J]. J Sci Food Agric, 2025, 105(8): 4586–4597. doi: 10.1002/jsfa.14198.

- [16] MOTALLEBI M, BHIA M, RAJANI H F, et al. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy [J]. *Life Sci*, 2022, 305: 120752. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120752.
- [17] LI M T, ZHENG Y, ZHAO J Y, et al. Polyphenol mechanisms against gastric cancer and their interactions with gut microbiota: A review [J]. *Curr Oncol*, 2022, 29(8): 5247–5261. doi: 10.3390/curroncol29080417.
- [18] DA FONSECA R N, MAGGIOLI M F, HÜBNER S D O, et al. Antiviral effects of flavonoids on animal viruses [J]. *Virology*, 2025, 610: 110596. doi: 10.1016/j.virol.2025.110596.
- [19] LOU H H, HU L F, LU H Y, et al. Metabolic engineering of microbial cell factories for biosynthesis of flavonoids: A review [J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4522. doi: 10.3390/molecules26154522.
- [20] CAO Y L, MEI Y Y, ZHANG R N, et al. Transcriptional regulation of flavonol biosynthesis in plants [J]. *Hort Res*, 2024, 11(4): uhae043. doi: 10.1093/hr/uhae043.
- [21] ZHUANG W B, LI Y H, SHU X C, et al. The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses [J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3599. doi: 10.3390/molecules28083599.
- [22] YANG L, WEN K S, RUAN X, et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 762. doi: 10.3390/molecules23040762.
- [23] LIU W X, FENG Y, YU S H, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12824. doi: 10.3390/ijms222312824.
- [24] BULANOV A N, ANDREEVA E A, TSVETKOVA N V, et al. Regulation of flavonoid biosynthesis by the MYB-bHLH-WDR (MBW) complex in plants and its specific features in cereals [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(2): 734. doi: 10.3390/ijms26020734.
- [25] DENG H, WU M B, WU Y, et al. *SIMYC2-SIMYB12* module orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulates fruit flavonoid metabolism in tomato [J]. *Plant Biotechnol J*, 2025, 23(2): 477–479. doi: 10.1111/pbi.14510.
- [26] LI C X, HUANG D, WEI R, et al. Genome-wide characterization, identification, and function analysis of candidate *JsMYB* genes involved in regulating flavonol biosynthesis in *Juglans sigillata* Dode [J]. *Sci Hort*, 2023, 317: 112044. doi: 10.1016/j.scienta.2023.112044.
- [27] BAI Q X, DUAN B B, MA J C, et al. Coexpression of *PalbHLH1* and *PalMYB90* genes from *Populus alba* enhances pathogen resistance in poplar by increasing the flavonoid content [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1772. doi: 10.3389/fpls.2019.01772.
- [28] TIAN Y W, LIU L X, CHEN X Y, et al. Integrated untargeted metabolome, full-length sequencing and transcriptome analyses reveal the mechanism of flavonoid biosynthesis in Blueberry (*Vaccinium* spp.) fruit [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(8): 4137. doi: 10.3390/ijms25084137.
- [29] DU Y W, MA H Y, LIU Y Y, et al. Major quality regulation network of flavonoid synthesis governing the bioactivity of black wolfberry [J]. *New Phytol*, 2024, 242(2): 558–575. doi: 10.1111/nph.19602.
- [30] ZHU X L, JIANG H D, PAN X F, et al. Dynamic metabolomic and transcriptomic profiling reveals yellow flower development in *Camellia perpetua*, a rare continuously flowering golden *Camellia* species [J]. *Hort Adv*, 2024, 2(1): 29. doi: 10.1007/s44281-024-00052-5.
- [31] LIU S Y, WANG Z T, ZHU R H, et al. Three differential expression analysis methods for RNA sequencing: Limma, EdgeR, DESeq2 [J]. *J Vis Exp*, 2021, 18(175): e62528. doi: 10.3791/62528.
- [32] LIU Y H, LI Y M, LIU Z, et al. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis revealed altitude-related regulatory mechanisms on flavonoid accumulation in potato tubers [J]. *Food Res Int*, 2023, 170: 112997. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112997.
- [33] ZHOU T S, YU Y B, XIAO B, et al. Engineering of a flavonoid 3'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*) for biosynthesis of B-3',4'-dihydroxylated flavones [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2017, 57(3): 447–458. [周天山, 余有本, 肖斌, 等. 操纵茶树类黄酮 3'-羟基化酶生物合成 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物 [J]. *微生物学报*, 2017, 57(3): 447–458. doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20160330.]
- [34] OUYANG Y N, LIU Y, PENG J S, et al. Function and genetic diversity analysis of *FiFLS1* from tartary buckwheat [J]. *J Plant Genet Res*, 2023, 24(5): 1401–1412. [欧阳屹南, 刘洋, 彭佳师, 等. 苦荞 *FiFLS1* 基因的功能和遗传多样性分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(5): 1401–1412. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20230226001.]
- [35] ZHOU X W, FAN Z Q, CHEN Y, et al. Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation [J]. *J Biosci*, 2013, 38(3): 593–604. doi: 10.1007/s12038-013-9339-2.
- [36] LIU Y J, HOU H, JIANG X L, et al. A WD40 repeat protein from *Camellia sinensis* regulates anthocyanin and proanthocyanidin accumulation through the formation of MYB-bHLH-WD40 ternary complexes [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1686. doi: 10.3390/ijms19061686.
- [37] YUE M L, JIANG L Y, ZHANG N T, et al. Regulation of flavonoids in strawberry fruits by *FaMYB5/FaMYB10* dominated MYB-bHLH-WD40 ternary complexes [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1145670. doi: 10.3389/fpls.2023.1145670.
- [38] WEERAWANICH K, HALBWIRTH H, SIRIKANTARAMAS S. A novel MYB transcription factor from durian (*Durio zibethinus*), *DzMYB1*, regulates flavonoid biosynthesis in fruit pulp [J]. *Sci Hort*, 2024, 333: 113246. doi: 10.1016/j.scienta.2024.113246.