基于比较转录组学的多花黄精黄酮类化合物合成基因表达分析

叶碧欢[1]，杨 阳[2]，朱杰丽[1]，石从广[1]，
陈友吾[1]，胡传久[1]，宋其岩[1]，李海波[*1]
（1. 浙江省林业科学研究院，浙江 杭州 310023；2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院，浙江 杭州 311300）

摘要：为了解药用植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua.中黄酮类化合物的生物合成途径，为黄精属植物黄酮类化合物的代谢与调控的分子机制研究提供数据，利用二代高通量测序技术，对分别培养了 3 个月和 9 个月的多花黄精组培苗根茎进行比较转录组学研究。结果显示，经序列组装与功能注释，多花黄精根茎的转录组数据经拼接共产生了 73 218 条 unigenes 序列，其中 35 511 条被注释；共鉴定出 83 条 unigenes 序列，分别编码 18 个参与黄酮类化合物合成的关键酶；在幼苗期根茎中表达的 1 359 个转录因子中，以 bHLH 最为丰富，其次是 ERF、MYB-relaed、C2H2 和 NAC。FPKM 表达分析显示，随着多花黄精块茎中黄酮类化合物的不断积累，18 个酶基因中的 9 个显著上调，3 个显著下调，6 个无明显表达差异。RT-qPCR 分析进一步验证了转录组 FPKM 结果的可靠性。本研究为解析黄精属植物黄酮类化合物的合成与积累机制提供了参考。

关键词：多花黄精；转录组；黄酮类化合物；生物合成
中图分类号：TS 201.4　**文章编号**：1673-1689(2022)04-0084-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.04.011

Analysis of Genes Expression Involved in Flavonoids Biosynthesis in *Polygonatum cyrtonema* Based on Comparative Transcriptome

YE Bihuan[1]，*YANG Yang*[2]，*ZHU Jieli*[1]，*SHI Congguang*[1]，
CHEN Youwu[1]，*HU Chuanjiu*[1]，*SONG Qiyan*[1]，*LI Haibo*[*1]
(1. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China; 2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: To understand the biosynthesis pathway of flavonoids in the medicinal plant *Polygonatum cyrtonema* and provide molecular data for the study on anabolism pathway and regulatory mechanism of flavonoids in *Polygonatum* plant, next-generation sequencing technique was emloyed to perform transcriptome sequencing on the rhizome of *P. cyrtonema* at development stage of 3 and 9 months. The results showed that a total of 73 218 unigenes were obtained by de novo transcriptome assembly,

收稿日期：2020-09-03
基金项目：浙江省中央财政林业科技推广项目(2017-TS04)；浙江省衢州市科技攻关项目(2018-K45)。
作者简介：叶碧欢(1989—)，女，博士，主要从事森林保护研究。E-mail：393938188@qq.com
* **通信作者**：李海波(1969—)，男，研究员，主要从事经济林育种研究。E-mail：lihaibozj@126.com

of which 35 511 were annotated. Eighty-three unigenes were identified from the transcriptome database, which encoded 18 key enzymes associated with flavonoids biosynthesis. Among the transcription factors expressed in rhizome of *P. cyrtonema* seedlings, bHLH was the main type, followed by ERF, MYB-relaed, C2H2 and NAC. Analysis of expression of 18 key enzymes based on FPKM showed that 9 were obviously up-regulated, 3 obviously down-regulated and 6 stably expressed with increasing flavonoid content in rhizome of *P. cyrtonema* seedlings. RT-qPCR analysis further verified the reliability of gene expression from FPKM. This present study provide a reference for further explore on the molecular mechanism on biosynthesis and accumulation of flavonoids in *Polygonatum* plant.

Keywords: *Polygonatum cyrtonema*, transcriptome, flavonoids, biosynthesis

黄精属 *Polygonatum* Mill. 隶属百合科(Liliaceae),为多年生草本植物,在世界范围内广泛分布。该属植物在我国有 31 种,除南方热带以外,南北方各有分布[1]。在黄精属植物的化学成分和药理活性研究方面,多集中于甾体皂苷和多糖二种主要活性成分[2-3],对黄酮类化合物的报道较少且不深入,大多为总黄酮提取工艺、含量测定以及生物活性评价[4-6]。通过比较《中国药典》记载的 3 种黄精新鲜块茎的总黄酮质量分数显示,黄精 *P. sibiricum* Red.、滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl.和多花黄精 *P. cyrtonema* Hua. 的总黄酮质量分数均比较低,分别为 0.018~0.035、0.015~0.030、0.004~0.034 mg/g,且在不同黄精属种间以及不同产地间存在很大差异[7]。

黄酮类化合物是一类广泛分布于植物体内的次生代谢物,目前已从黄精属 8 种植物中共分离出 6 种(高异黄酮类、异黄酮类、黄酮类、查耳酮类、二氢黄酮类、紫檀烷类)不同结构亚型的化合物 54 个[8],其中高异黄酮类(Homoisoflavones)最多,是该属植物的特征性成分,在自然界颇为少见,有降血糖、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老等药理活性,具有重要的研究价值[9-10]。因此,研究黄精属植物中黄酮类,特别是高异黄酮类化合物的生物合成途径与调控机制,可为黄酮类化合物的合成生物学研究奠定基础,也为通过外源诱导手段促进黄酮类物质的大量积累,以及今后黄酮类药物和保健品的产业化研发开辟新的来源途径。

近年来,转录组测序技术已广泛用于药用植物新基因的发现、分子标记挖掘、代谢途径的确定等研究,有助于次生代谢相关基因的挖掘与功能研究[11-16]。迄今,黄精属植物的转录组学研究多在黄精和滇黄精 2 个物种上开展,且以多糖和甾体皂苷为主[17-21],在多花黄精物种上仅有多糖合成相关基因的报道[20],有关黄精属植物黄酮类化合物生物合成途径的分析与相关基因鉴定尚属空白。

作者将对多花黄精组培苗不同发育期的根茎进行比较转录组学研究,拟基于转录组数据的组装与注释,鉴定与黄酮类化合物生物合成相关的关键基因,并对在多花黄精幼苗期根茎中表达的转录因子(Transcription factor,TF)进行鉴定与分类。基于转录组 FPKM 数据筛选块茎不同发育期的差异表达基因,分析差异表达基因在次生代谢通路的富集,比较黄酮类化合物生物合成关键基因在不同发育期块茎中的差异表达,并进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证。本研究可弥补黄精属植物黄酮类化合物生物合成途径基因资源的空白,为后续研究黄酮类化合物合成与积累的分子调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

以多花黄精种子作为外植体,经消毒处理后无菌诱导其植株再生,建立组培快繁体系。组培培养基为 1/2 MS(Murashige & Skoog)。培养条件为温度 25 ℃,湿度 50%,光照 2 500 200 lx。以培养于浙江省林业科学研究院林木育种组培实验室的多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* 组培苗为试材。从组培瓶中取出分别培养了 3 个月和 9 个月的多花黄精幼苗,切去茎叶,取带芽根茎立即用液氮速冻,存储于-80 ℃作为转录组学研究用材料。两种材料均取 6 瓶,其中 3 瓶以去除须根后的块茎作为总黄酮质

量分数分析的 3 个生物学重复,另 3 瓶作为转录组测序的 3 个生物学重复。

1.2 总黄酮质量分数测定

多花黄精块茎总黄酮的测定参考文献[22]的方法,以芦丁作为对照品,利用紫外分光光度计测定各样品 510 nm 处的吸光度($A_{510\,nm}$)。以芦丁质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制出标准曲线,得到回归方程。多花黄精块茎总黄酮的提取参考文献[23]的方法并略微修改,即称取完全干燥粉碎的块茎 10 g,加入甲醇 500 mL,于 40 ℃下超声提取 1 h,过滤,取滤液 60 mL,加入 100 mL 酸解液(75 mL 甲醇+25 mL 盐酸),水浴回流酸解 100 min,加甲醇定容,过滤,取滤液检测 $A_{510\,nm}$。根据芦丁标准曲线和回归方程,计算不同样品的总黄酮质量分数。

$$I=C\times N\times V/m$$

式中:I 为总黄酮质量分数,mg/g;C 为样品提取液的总黄酮质量浓度,mg/mL;N 稀释倍数;V 为定容体积,mL;m 为多花黄精块茎样品质量,g。

1.3 转录组测序与序列组装和功能注释

转录组测序与序列组装和功能注释的具体方法参考作者所在课题组前期研究报告[24],简述为:采用 Plant Total RNA Miniprep Purification Kit(TR02,GeneMark,Taiwan,China)提取多花黄精根茎的总 RNA。采用 SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing(Agilent Technologies,G9691)构建测序文库;使用 Trinity 软件(v2012-10-15)对测序得到的高质量 clean reads 从头组装,再利用 CAP3(r12/21/07)软件拼接为 unigene;将 unigene 序列比对到 Nr、SwissProt、KEGG、COG/KOG 和 Pfam 蛋白数据库以及拟南芥基因组数据库 TAIR10(E-value≤1×10^{-5}),得到与给定 unigene 具有最高序列相似的蛋白质,获得蛋白质功能注释信息。

1.4 转录因子鉴定

利用 Blast 程序(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)将 unigene 序列与 Nr 蛋白数据库中的转录因子信息进行相似性比对(阈值:E-value≤1×10^{-5}),得到与给定 unigene 具有最高序列相似性的 TF,获得 TF 注释信息。

1.5 差异表达基因的筛选与功能富集分析

采用 Cuffdiff(v 2.1.1)软件计算 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)值[25]作为衡量转录本表达水平的指标,使用错误发现率 FDR(False discovery rate)进行可信度检验。差异表达基因的筛选标准为:倍数差异(Fold change,FC)≥2,FDR<0.01。根据基因在不同样品中的表达量进行差异表达分析与功能富集分析,差异表达基因的 KEGG 富集分析采用 KOBAS(v 2.0)软件。基于 KEGG 注释的代谢途径统计与次生代谢相关的 unigene 数量,基于 Nr 和 TAIR10 注释信息统计与黄酮生物合成相关的 unigene 数量。根据注释结果鉴定参与黄酮类化合物生物合成途径的 unigene 及其编码的代谢酶。

1.6 RT-qPCR 分析基因表达

取上述 1.3 中用于转录组测序的 RNA 样品进行 RT-qPCR 分析。以 RNA 为模板使用 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit(Perfect Real Time)逆转录合成 cDNA 第一链,逆转录方法参照试剂盒说明。用于 RT-qPCR 分析的内参基因为 *UBQ-E2-10* 和 *EF-1α2*。扩增目的基因和内参基因的引物序列见 2.1 部分。使用 Oligo 7.57 软件设计特异性引物,引物合成由杭州有康生物科技有限公司完成。

RT-qPCR 分析参考作者所在课题组前期研究报告[26],具体为:反应在 LineGene 9600 Plus 上进行。反应体系为(10 μL):cDNA 模板 1 μL,上、下游引物均为 0.2 μL,2 ×SYBR Green Mix(BioEasy Master Mix)5 μL,ddH_2O 3.6 μL。扩增程序为:恒温段 95 ℃ 2 min;循环段 95 ℃ 15 s,60 ℃ 20 s,40 个循环;溶解段 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。每个实验设 3 个技术重复。

采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法[27]计算 RT-qPCR 实验中的基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 多花黄精转录组测序结果

基于 Illumina HiSeq 2500 测序平台获得多花黄精 3 个月和 9 个月幼苗期根茎的转录组数据。经对原始数据进行统计,去除 raw data 中的接头序列及低质量 reads,共获得约 12 GB 的高质量 clean data。通过对 2 个时期转录本数据的合并组装,经拼接后共得到 73 218 条 unigenes 序列(≥300 bp),其中长度在 1 kb 以上的有 17 249 条。所有 unigenes 序列与各大数据库进行注释比对,结果显示,共有 35

511 条 unigenes 获得基因注释信息，占全部 unigenes 的48.5%，其中长度大于 1 kb 以上的有 16 640 条(见表 1)。

表 1　数据库注释的 unigene 数量

Table 1　Annotated unigene numbers in databases

数据库	unigene 数量	300~1 000 bp	≥1 000 bp
Nr	34 391	18 999	15 519
SwissPort	24 469	9 348	14 267
COG/KOG	19 272	7 716	10 831
KEGG	16 241	6 985	8 526
TAIR10	32 481	14 029	16 926
Pfam	20 355	7 648	12 231
Total	35 511	18 871	16 640

注:Total 为去除各数据库的重复注释后的 unigene 数量。

2.2　黄酮类化合物生物合成相关酶基因鉴定

根据对 2 个不同发育期根茎样品在各大数据库的整体注释,共鉴定出与黄酮类化合物生物合成相关的 unigenes 83 条,编码 18 个代谢酶(见表 2)。目前,异黄酮类化合物(Isoflavones)的生物合成途径比较明确，涉及的关键酶包括 PAL、CHS、CHI 和异黄酮合成酶(IFS)[28-31]。本研究在鉴定出的 83 个酶基因中包括了 PAL、CHS、CHI、F3H、FLS、DFR、F3′,5′H 等一批黄酮类化合物生物合成的关键性酶基因,但 IFS 酶基因没有得到注释,这可能是由于在培养了 3~9 个月的多花黄精幼苗期,其根茎中 IFS 基因尚未充分表达,也可能与 unigenes 的组装拼接质量有关。

表 2　多花黄精转录组黄酮类化合物合成途径中的酶基因

Table 2　Genes involved in the synthetic pathway of flavonoids in *P. cyrtonema* transcriptome

编号	酶	英文名	缩写	unigene 数量	EC 编号
1	苯丙氨酸解氨酶	Phenylalanine ammonia-lyase	PAL	4	E4.3.1.24
2	4-香豆酸辅酶 A 连接酶	4-coumarate-CoA ligase	4CL	10	E6.2.1.12
3	反式肉桂酸 4-单加氧酶	Trans-cinnamate 4-monooxygenase	CYP73A	4	E1.14.13.11
4	查耳酮合酶	Chalcone synthase	CHS	13	E2.3.1.74
5	查尔酮异构酶	Chalcone isomerase	CHI	3	E5.5.1.6
6	柚皮素 3-双加氧酶	Naringenin 3-dioxygenase	F3H	1	E1.14.11.9
7	双功能二氢黄酮醇 4-还原酶	Bifunctional dihydroflavonol 4-reductase	DFR	2	E1.1.1.219
8	花青素合成酶	Anthocyanidin synthase	ANS	2	E1.14.20.4
9	无色花青素还原酶	Leucoanthocyanidin reductase	LAR	1	E1.17.1.3
10	黄酮醇合成酶	Flavonol synthase	FLS	2	E1.14.20.6
11	UDP-糖基转移酶	UDP-glycosyltransferase	UGT	5	E2.4.1.-
12	类黄酮 3'-单加氧酶	Flavonoid 3′-monooxygenase	F3′H	3	E1.14.14.82
13	类黄酮 3',5'-羟化酶	Flavonoid 3′,5′-hydroxylase	F3′,5′H	1	E1.14.14.81
14	咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	CCOMT	7	E2.1.1.104
15	咖啡酸-3-O-甲基转移酶	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	COMT	5	E2.1.1.68
16	类黄酮 3',5'-O-甲基转移酶	Flavonoid 3′,5′-O-methyltransferase	F3′,5′MT	1	E2.1.1.267
17	莽草酸羟基肉桂酰转移酶	Shikimate O-hydroxycinnamoyl transferase	HCT	17	E2.3.1.133
18	5-O-(4-香豆酰基)-*D*-奎尼酸	5-O-(4-coumaroyl)-*D*-quinate 3′-monooxygenase	C3′H	2	E1.14.13.36

2.3　转录因子分析

转录因子是在转录水平上调控结构基因表达的关键因素之一,在调节植物生长发育、活性成分合成和环境胁迫中的基因表达发挥了主要作用。许多转录因子家族由不同的基因家族组成，包括 bHLH、ERF、MYB-relaed、C2H2、NAC(NAM,ATAF1/2,CUC1/2)等。转录组数据显示,在多花黄精幼苗期的根茎中,共有 1 359 个编码转录因子的基因表达,可以分类为 56 个 TF 家族(见图 1),以 bHLH 类型最丰富(94 个,占比 6.92%),其次是 ERF(82 个,占比 6.03%),MYB-relaed(79 个,占比 5.81%)、C2H2(67 个,占比 4.93%)和 NAC(58 个,占比 4.27%)。MYB-relaed 和 bHLH 转录因子单独或协作调节类黄酮次生代谢生物合成途径中结构基因的表达,从而控制

植物体内类黄酮的生物合成[32]。利用 bHLH 转录因子调节药用植物活性物质生物合成的研究备受关注,其对黄酮类物质(花青素等)、生物碱(尼古丁等)、萜类等活性成分生物合成的调控作用已被证实[33]。本研究中鉴定的转录因子为今后研究多花黄精活性成分(多糖、皂苷和黄酮类化合物等)的积累与外源调控机制提供了丰富的基础数据。

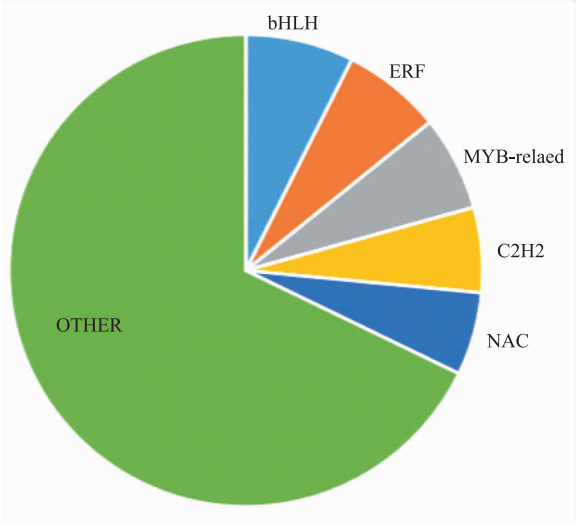


图 1　多花黄精转录组中转录因子的分布

Fig. 1　Distribution of transcription factors in *P. cyrtonema* transcriptome

2.4　不同发育期差异表达基因的筛选与分析

筛选多花黄精 2 个不同发育期根茎样品间表达水平显著差异的基因,形成差异基因数据库。通过分析差异基因数据库共获得 2 602 个差异基因,占总被注释 unigene 的 7.33%,其中上调基因 1 866 个,下调基因 736 个(见图 2)。这些差异表达基因为后续开展次生代谢通路分析提供了基础数据。

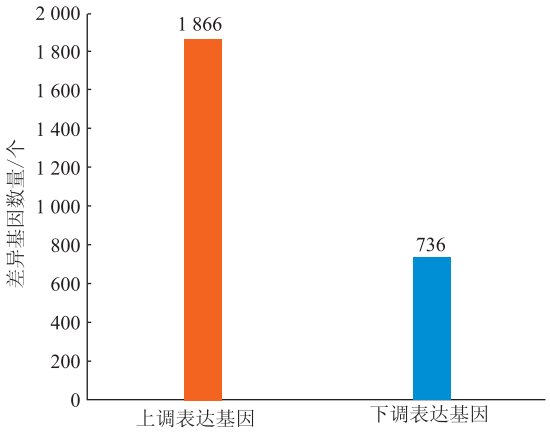


图 2　多花黄精不同发育期块茎的差异表达基因

Fig. 2　Differentially expressed genes in *P. cyrtonema* rhizome at different development stages

2.5　差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

为了进一步了解 2 个不同发育期根茎样品间差异表达基因参与的代谢通路,对这些差异表达基因进一步利用 KOBAS 进行 KEGG 富集分析,发现有 497 条 unigenes 注释到了 109 个代谢通路中,且主要富集在代谢组(Metabolism)和遗传信息处理组(Genetic information processing)。其中富集的前 20 条通路统计如图 3 所示。

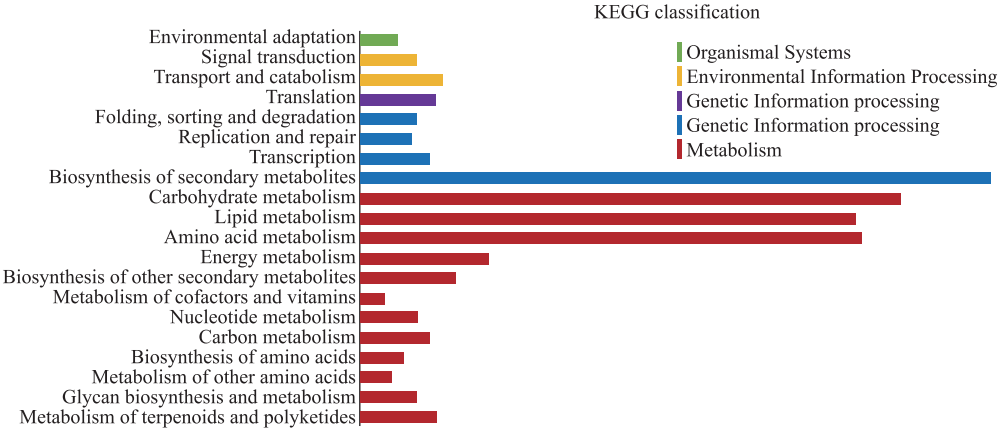


图 3　差异表达基因的 KEGG 注释分类

Fig. 3　KEGG classification for differentially expressed genes in *P. cyrtonema* rhizome

在 497 条 unigenes 富集的 109 个 KEGG 代谢通路中,其中 186 条定位到了 19 个次生代谢物生物合成通路中,数量最多的是参与次生代谢物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)通路,共 118 条,最少的是咖啡碱代谢(Caffeine metabolism)、吲哚类生物碱合成(Indole alkaloid biosynthesis)、黄酮和黄酮醇类合成(Flavone and flavonol biosynthesis)和硫代葡萄糖苷合成(Glucosinolate biosynthesis)通路,都仅只有 1 条(见表 3)。此外,这些差异表达的酶基因也参与了像二苯乙烯类(Stilbenoids)、苯丙素(Phenylpropanoids)、萜类(Terpenoids)、托品烷类(Tropanes)、类胡萝卜素(Carotenoids)、油菜素甾醇(Brassinosteroids)、黄酮类(Flavonoids)和甾体(Steroids)等次生代谢物的合成。

表 3　与多花黄精次生代谢相关的 unigenes

Table 3　Unigenes related to secondary metabolism of *P. cyrtonema*

次生代谢物合成通路	unigene 数量	次生代谢物合成通路	unigene 数量
次生代谢物合成	118	油菜素甾醇生物合成	2
苯丙素生物合成	14	玉米素生物合成	2
萜类骨架生物合成	9	倍半萜和三萜生物合成	2
黄酮类生物合成	7	单萜生物合成	2
甾体生物合成	7	单环菌素生物合成	2
类胡萝卜素生物合成	5	咖啡碱代谢	1
托烷、哌啶和吡啶生物碱生物合成	3	吲哚类生物碱合成	1
二萜生物合成	3	黄酮和黄酮醇类合成	1
异喹啉生物碱生物合成	3	硫代葡萄糖苷合成	1
芪类、二芳基庚烷类和姜酚生物合成	3		

2.6　黄酮类化合物合成途径中基因表达差异的初步分析

对多花黄精组培苗在 3 个月和 9 个月发育期块茎的总黄酮质量分数分析显示,3 个月发育期块茎中总黄酮的平均质量分数为 0.008 mg/g,9 个月为 0.012 mg/g,表明随着根茎的不断发育,其总黄酮质量分数也在不断积累。基于 FPKM 值比较在 3 个月和 9 个月发育期块茎的黄酮类化合物合成途径中关键酶基因的表达水平,发现 9 个基因显著上调,分别是 PAL、4CL、DFR、ANS、FLS、UGT、F3′H、COMT 和 F3′,5′MT 基因,上调倍数为 1.9~11.2;3 个基因显著下调,分别是 CHS、CHI 和 F3′,5′H 基因,下调倍数为 0.3~0.5;6 个基因的表达无明显表达差异,分别是 CYP73A、F3H、LAR、CCOMT、HCT 和 C3′H 基因,这些基因的表达变化倍数为 0.9~1.3(见表 4)。这表明随着块茎中总黄酮质量分数的不断积累,其黄酮类化合物合成途径中基因的差异表达并不一致,这也预示了多花黄精复杂的黄酮类化

表 4　黄酮类化合物合成途径中的基因表达差异

Table 4　Different gene expression involved in flavonoids biosynthesis

unigene 及编码酶	FPKM 值		差异表达倍数	unigene 及编码酶	FPKM 值		差异表达倍数
	3 个月	9 个月			3 个月	9 个月	
U0025898, PAL	86.6	200.9	+2.3	U0016642, FLS	5.3	15.6	+2.9
U0095286, 4CL	152.1	412.2	+2.7	U0017439, UGT	3.6	16.3	+4.5
U0070317, CYP73A	208.8	184.7	+1.1	U0072302, F3′H	5.7	20.2	+3.5
U0025963, CHS	130.1	36.7	−0.3	U0095406, F3′,5′H	0.56	0.24	−0.4
U0082711, CHI	159.5	72.3	−0.5	U0069086, CCOMT	85.3	108.3	+1.3
U0067517, F3H	13.1	15.8	+1.2	U0079750, COMT	5.4	19.5	+3.6
U0071962, DFR	38.4	430.8	+11.2	U0083617, F3′,5′MT	150.2	650.3	+4.3
U0083155, ANS	8.0	15.4	+1.9	U0019368, HCT	96.3	125.2	+1.3
U0074845, LAR	79.2	105.3	+1.3	U0077639, C3′H	61.2	55.8	−0.9

注:+代表上调,−代表下调。

合物合成机制。

2.7 RT-qPCR 验证黄酮类化合物生物合成相关酶基因的表达

为验证 18 个黄酮类化合物合成酶基因在不同发育期根茎中基于 FPKM 值表达变化的可靠性，选取其中的 7 个酶基因进一步进行 RT-qPCR 分析，并绘制标准曲线。结果显示，所有酶基因和内参基因（*UBQ-E2-10* 和 *EF-1α2*）标准曲线的相关系数（R^2）均≥0.97，扩增效率均在 90%~110%（见表 5），表明所有 RT-qPCR 引物的扩增具有高特异性，且扩增效率一致，满足利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对定量分析。基因表达结果显示（见图 4），这 7 个酶基因在不同发育期根茎中的差异表达与转录组 FPKM 结果基本吻合，只是这两种分析结果的差异表达倍数略有不同。

表 5 用于 RT-qPCR 分析的多花黄精黄酮类化合物生物合成相关酶基因

Table 5 Genes involved in flavonoid biosynthesis in *P. cyrtonema* used for RT-qPCR analysis

Unigene	酶基因	引物序列 (5′→3′)	斜率	相关系数	扩增效率/%
U0025898	苯丙氨酸解氨酶（PAL）基因	F: ACCATCTTCTTCGCTCCATAC	−3.53	0.98	91.96
		R: AGATCAGATGGATTCAGCTCAC			
U0025963	查耳酮合酶（CHS）基因	F: CCAGGCTCTTCTCTATGTTCTTC 601CTCTTCTCTATGTTCTTC	−3.29	0.99	101.50
		R: CGGCATCCCAGACGATATTAC			
U0071962	双功能二氢黄酮醇 4-还原酶（DFR）基因	F: GGATGGCTCCTTCATACATCTC	−3.15	0.97	107.54
		R: CAATCCCTTCGAACTCAGTAGG			
U0016642	黄酮醇合成酶（FLS）基因	F: CATTGGGCACAAGAACAGTTAG	−3.44	0.97	95.45
		R: CTTCATCAGCATCTCTAGCTCC			
U0095406	类黄酮 3’, 5’-羟化酶（F3′, 5′H）基因	F: TCCAATCCGATCGTCGTTTAAT	−3.37	0.99	91.56
		R: AGAAGTGGTGGATGGTTGTG			
U0017439	UDP-糖基转移酶（UGT）基因	F: CTCCTTTCCTCGGCTTCTTTAC	−3.45	0.98	93.87
		R: TCTTATCGTTCGCTGCAAGG			
U0079750	咖啡酸-3-O-甲基转移酶（COMT）基因	F: TAGGCGGAGCATCAGAGATA	−3.26	0.97	103.5
		R: GCTTGTCGATGTAGGTGGAA			
U0078415	*UBQ-E2-10* (内参)	F: GGACCCAGAAGTACGCAATG	−3.20	0.99	105.45
		R: AATTACCAGGGATACAGCACC			
U0077648	*EF-1α2* (内参)	F: CCCTTCTTGACGCTCTTGAC	−3.54	0.98	91.81
		R: GAGCTTCATGGTGCATCTCA			

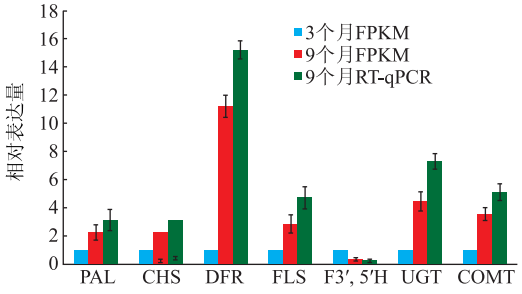


图 4 多花黄精 7 个黄酮类化合物生物合成相关酶基因的表达

Fig. 4 Expression of 7 genes involved in flavonoid biosynthesis in *P. cyrtonema*

3 结 语

利用二代高通量测序技术，对黄精属原生药材多花黄精幼苗期根茎进行转录组测序，经组装拼接共产生了 73 218 条 unigenes 序列，其中 35 511 条被注释；共鉴定出 83 条 unigenes 序列，分别编码 18 个参与黄酮类化合物生物合成的关键酶；在幼苗期根茎中表达的 1 359 个转录因子中，以 bHLH 最为丰富，其次是 ERF、MYB-relaed、C2H2 和 NAC。基于 FPKM 表达分析显示，随着多花黄精块茎中黄酮化合物的不断积累，其黄酮类化合物合成途径中基因的表达并不一致，18 个酶基因中的 9 个显著上调，3 个显著下调，6 个无明显表达差异。与前期报道的药用植物黄酮类化合物转录组学研究[34-38]相比，本研究鉴定出的黄酮类化合物合成酶的基因数量和种类有些许不同，例如细胞色素 CYP450 基因、异黄酮合成酶（IFS）基因等，这可能是由于药用植物在幼苗

期根茎发育过程中黄酮类化合物生物合成相关酶基因的表达与叶、花、茎等器官中的表达水平不同而致,也可能与多花黄精的物种特异性有关,这也预示了不同物种间黄酮类化合物的生物合成机理存在一定差异,百合科的黄精属植物可能具有更为复杂的黄酮类化合物生物合成机制。本研究为后续解析黄精属植物黄酮类活性成分的合成、积累与外源调控机制奠定了基础。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 15 卷[M]. 北京:科学出版社,1978.
[2] 陈辉,冯珊珊,孙彦君,等. 3 种药用黄精的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2015,46(15):2329-2338.
[3] 姜程曦,张铁军,陈常青,等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药,2017,48(1):1-16.
[4] 张娇娇,张睿,宁伟. 热河黄精多糖含量及总黄酮超声提取方法研究[J]. 中草药,2015,26(12):2870-2871.
[5] 张传海,林志銮,李宝银,等. 闽北林下种植多花黄精的总黄酮含量分析及其生物活性评价[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(2):225-231.
[6] 李小红,杨显辉,李安,等. 滇黄精总黄酮超声辅助双水相提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):234-238.
[7] 焦劼,陈黎明,孙瑞泽,等. 不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析[J]. 中药材,2016,39(3):519-522.
[8] 陶爱恩,张晓灿,杜泽飞,等. 黄精属植物中黄酮类化合物及其药理活性研究进展[J]. 中草药,2018,49(9):2163-2171.
[9] 马锐,吴胜本. 中药黄酮类化合物药理作用及作用机制研究进展[J]. 中国药物警戒,2013,10(5):286-290.
[10] 李萌茹,周玉枝,杜冠华,等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 药学学报,2019 ,54(8):1382-1391.
[11] 徐惠龙,汪英俊,陈鸣,等. 基于 ISSR 标记的福建省多花黄精与长梗黄精种质鉴别及遗传多样性分析[J]. 福建农业学报,2017,32(6):619-624.
[12] MONIKA S,JAKUB S,KORNELIA P,et al. Comparison of three *Polygonatum* species from poland based on DNA markers[J]. **Annales Botanici Fennici**,2006,43(5):379-388.
[13] 周晔,唐 铖,张 攻,等. 随机扩增多态性 DMA 技术与简单序列重复标记法探讨部分黄精属药用植物亲缘关系的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(7):1646-1647.
[14] 张红梅. 安徽省黄精种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
[15] 杨培,周红,辛天怡,等. 黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界中医药,2015,10(8):1173-1176.
[16] 刘越,范增华,孙洪波,等. 裂叶牵牛获得表达序列标签资源的简单序列重复信息分析[J]. 中国药学杂志,2011,46(23):1790-1794.
[17] 党凯凯. 黄精甾体皂苷合成途径相关酶基因研究[D]. 西安:陕西师范大学,2017.
[18] 王世强. 基于糖组、代谢组和转录组的黄精种质资源研究[D]. 西安:陕西师范大学,2017.
[19] WANG B,WANG S,HUA W,et al. De novo assembly and analysis of *Polygonatum sibiricum* transcriptome and identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2017,18(9):1950.
[20] WANG C K,PENG D Y,ZHU J H,et al. Transcriptome analysis of *Polygonatum cyrtonema* Hua:identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis[J]. **Plant Methods**,2019,15:65.
[21] YANG Z Y,YANG L F,LIU C K,et al. Transcriptome analyses of *Paris polyphylla* var. *chinensis*,*Ypsilandra thibetica*,and *Polygonatum kingianum* characterize their steroidal saponin biosynthesis pathway[J]. **Fitoterapia**,2019,135:52-63.
[22] 张传海,林志銮,李宝银,等. 闽北林下种植多花黄精的总黄酮含量分析及其生物活性评价[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(1):225-231.
[23] 罗美红,吕寒,李维林,等. 枇杷叶中总黄酮含量的高效液相色谱测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):582-583.
[24] 廖荣俊,杨阳,叶碧欢,等. 多花黄精根茎的转录组分析与甾体皂苷生物合成相关基因发掘[J]. 中国中药杂志,2020,45(7):1648-1656.
[25] TRAPNELL C,HENDRICKSON D G,SAUVAGEAU M,et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution

with RNA-seq[J]. **Nature Biotechnology**,2013,31(1):46-53.
[26] 杨阳,叶碧欢,宋其岩,等. 多花黄精块茎发育和胁迫条件下 qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. 中国中药杂志,2020,45(24):5967-5975.
[27] 李楠,郑勇奇,丁红梅,等. 低温胁迫下短枝木麻黄耐寒相关基因的差异表达分析[J]. 林业科学,2017,53(7):62-71.
[28] 陈宣钦,张乐,徐慧妮,等. 大豆异黄酮生物合成关键酶及其代谢工程研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(7):133-138.
[29] 练云,魏荷,雷晨芳,等. 大豆籽粒异黄酮含量与 IFS1 基因相对表达量的关系[J]. 分子植物育种,2014,12(1):62-68.
[30] 康亚兰,裴瑾,蔡文龙,等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展[J]. 中草药,2014,45(9):1336-1341.
[31] 崔艳伟,李文龙,常文锁,等. 大豆异黄酮合成途径相关基因差异表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(4):719-725.
[32] 沈忠伟,许昱,夏彝,等. 植物类黄酮次生代谢生物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用[J]. 分子植物育种,2008,6(3):542-548.
[33] 张鑫,宋经元,胡鸢雷,等. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展[J]. 药学学报,2014,49(4):435-442.
[34] 马婧,邓楠,褚建民,等. 泡泡刺高通量转录组鉴定及其黄酮类代谢途径初步分析[J]. 林业科学研究,2016,29(1):61-66.
[35] 马婧,成铁龙,孙灿岳,等. 草麻黄高通量转录组分析及黄酮类代谢途径相关基因的鉴定[J]. 浙江农业学报,2016,28(4):609-617.
[36] HAN S,WU Z,JIN Y,et al. RNA-Seq analysis for transcriptome assembly,gene identification,and SSR mining in ginkgo(*Ginkgo biloba* L.)[J]. **Tree Genetics & Genomes**,2015,11:37.
[37] 宋菊,黄剑,李志栋,等. 多穗柯转录组分析及黄酮类化合物合成相关基因的挖掘[J]. 中国中药杂志,2017,42(2):675-679.
[38] 何江,马艺沔,杨伟俊,等. 基于转录组测序挖掘新塔花黄酮类物质生物合成相关基因[J]. 中国中药杂志,2019,44(15):3178-3186.

科　技　信　息

美国制订测定食品中亚硫酸盐浓度的新分析方法

2022 年 1 月 14 日,美国联邦公报消息,美国食药局(FDA)发布 2022—00816 号公告,制订用于确定食品中亚硫酸盐浓度的分析方法,能够快速检测食品中亚硫酸盐。主要内容包括:

(1)使用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)方法替代美国分析化学家协会(AOAC)官方检测方法测定食品中的亚硫酸盐质量浓度,检测限为 10 mg/kg。液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)一次能够同时检测 30 个样品;

(2)修订美国联邦法规 21CFR 第 101 部分食品标签内容为:可以使用液相色谱串联质谱法测定食品中亚硫酸盐(二氧化硫、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、焦亚硫酸钠和焦亚硫酸钾等)含量,检测限为 10 mg/kg;

(3)修订 21CFR 第 130 部分食品标准中关于亚硫酸盐的内容为:食品中亚硫酸盐质量浓度超过 10 mg/kg 时,须在食品标签中标识所含亚硫酸盐品种; 食品中亚硫酸盐的含量可以使用液相色谱串联质谱法和美国分析化学家协会(AOAC)方法。

该公告将在 2022 年 1 月 18 日的联邦公报上正式发布 30 日后生效。

[信息来源]海关总署.美国制订测定食品中亚硫酸盐浓度的新分析方法[EB/OL]. (2022-2-7).http://www.tbtguide.com/xwdt/gwxw/202202/t20220207_1982561.html