

代谢组与转录组联合分析镉胁迫下浙麦冬黄酮类化合物积累及生物合成途径

高聳¹, 邱梦丽², 李晴², 赵倩², 牛二利^{1*}

1 浙江省农业科学院 作物与核技术利用研究所, 浙江 杭州 310021

2 浙江科技大学 生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

高聳, 邱梦丽, 李晴, 赵倩, 牛二利. 代谢组与转录组联合分析镉胁迫下浙麦冬黄酮类化合物积累及生物合成途径[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 588-601.

GAO Song, QIU Mengli, LI Qing, ZHAO Qian, NIU Erli. Integrated transcriptomics and metabolomics analysis of flavonoid biosynthesis in *Ophiopogon japonicum* under cadmium stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 588-601.

摘要: 浙麦冬是浙江省特有的珍贵药用植物, 其块根富含黄酮类等生物活性成分, 具有抗炎、抗氧化及免疫调节作用。为揭示镉胁迫对浙麦冬黄酮类化合物积累及其生物合成途径的影响, 本研究通过不同浓度镉胁迫处理浙麦冬, 并借助代谢组学与转录组学联合分析手段探索其变化特征。结果表明, 中镉(1 mg/L)和高镉(10 mg/L)等不同浓度镉胁迫处理后浙麦冬黄酮类化合物含量显著增加, 且随着镉浓度的升高含量进一步增加。代谢组学分析揭示, 浙麦冬中共检测到黄酮类代谢物共 110 种, 包括黄酮类、黄烷醇类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类衍生物、黄烷酮类、异黄酮类、查耳酮和二氢查耳酮类以及花青素类等, 其中黄酮类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类衍生物以及花青素类在不同浓度镉胁迫处理后均显著富集。通过转录组分析, 筛选出多个与黄酮类合成相关的关键基因在镉胁迫后显著上调表达, 包括 14 个编码 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)、2 个查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和 14 个编码苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)的基因。基因-代谢物调控网络分析显示, 4CL (*Cluster-21637.5012*、*Cluster-21637.90648*、*Cluster-21637.62637*)、CHI (*Cluster-21637.111909*、*Cluster-21637.123300*)与多种黄酮类代谢物之间存在显著正相关性, 提示这些基因通过调控黄酮类代谢物的合成, 促进了镉胁迫处理下总黄酮量的积累, 为镉污染环境中药用植物的栽培和利用提供了理论支持。

关键词: 浙麦冬; 镉胁迫; 黄酮合成; 组学联合分析

资助项目: 浙江省数字旱粮重点实验室(2022E10012); 浙江省旱粮新品种选育重大科技专项(2021C02064)

This work was supported by the Key Laboratory of Digital Upland Crops of Zhejiang Province (2022E10012) and the Zhejiang Science and Technology Major Program on Agricultural New Variety Breeding (2021C02064).

*Corresponding author. E-mail: niuerli@zaas.ac.cn

Received: 2024-08-14; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-11-19

Integrated transcriptomics and metabolomics analysis of flavonoid biosynthesis in *Ophiopogon japonicus* under cadmium stress

GAO Song¹, QIU Mengli², LI Qing², ZHAO Qian², NIU Erli^{1*}

¹ Institute of Crops and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

² School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

Abstract: *Ophiopogon japonicus*, a precious medicinal plant endemic to Zhejiang Province. Its tuberous roots are rich in bioactive components such as flavonoids, possessing anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory properties. To elucidate the impact of cadmium (Cd) stress on the accumulation and biosynthetic pathway of flavonoids in *O. japonicus*, this study exposed *O. japonicus* to different concentrations of Cd stress and explored the changes through integrated transcriptomics and metabolomics analysis. The results demonstrated that Cd stress (1 mg/L and 10 mg/L) significantly increased the content of flavonoids in *O. japonicus* in a concentration-dependent manner. The metabolomics analysis revealed a total of 110 flavonoids including flavones, flavanols, flavonols, flavone and flavonol derivatives, flavanones, isoflavonoids, chalcones and dihydrochalcones, and anthocyanins in *O. japonicus*, among which flavones, flavonols, flavone and flavonol derivatives, and anthocyanins increased under Cd stress. The transcriptomics analysis identified several key flavonoid biosynthesis-associated genes with up-regulated expression under Cd stress, including 14 genes encoding 4-coumarate CoA ligase (4CL), 2 genes encoding chalcone isomerase (CHI), and 14 genes encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL). The gene-metabolite regulatory network indicated significant positive correlations of 4CL (*Cluster-21637.5012*, *Cluster-21637.90648*, and *Cluster-21637.62637*) and CHI (*Cluster-21637.111909* and *Cluster-21637.123300*) with flavonoid metabolites, suggesting that these genes promoted the synthesis of specific flavonoid metabolites, which led to the accumulation of total flavonoids under Cd stress. These findings provide theoretical support for the cultivation and utilization of medicinal plants in Cd-contaminated environments and offered new perspectives for studying plant responses to heavy metal stress.

Keywords: *Ophiopogon japonicus*; cadmium stress; flavonoid biosynthesis; integrated omics analysis

浙麦冬(*Ophiopogon japonicus*)最早记载于《神农本草经》，是浙江省独有的珍贵药用植物，隶属于著名的“浙八味”之一，以其养阴生津、润肺清心的卓越功效而闻名^[1]。浙麦冬的块根含有甾体皂苷、黄酮类、氨基酸类和多糖类等生物活性成分，具有显著的抗炎、抗氧化和免疫调节作用^[2]。独特的药理特性不仅赋予浙麦冬极高的药用价值，其在现代医学研究中

也显示出抗肿瘤和增强免疫力的潜力^[3]。此外，浙麦冬耐逆性强、易于栽培，目前已成为上百种中成药的重要原料，应用前景广阔。

黄酮类化合物是浙麦冬中重要的次生代谢产物，主要通过苯丙烷途径合成，包括黄酮(flavones)、黄酮醇(flavonols)、异黄酮(isoflavones)、黄烷酮(flavanones)、黄烷醇(flavanols)和花青素(anthocyanidins)这 6 大类。已有研究表明，黄

酮类化合物通过调节植物的抗氧化系统, 增强其对不利环境条件的适应能力。例如, Wu 等^[4]利用转录组学和代谢组学分析揭示了黄酮类化合物在茶树抗冻过程中起正向调节作用; Rao 等^[5]发现黄酮类化合物可增强酸橙的抗氧化活性, 消除干旱胁迫期间产生的活性氧。黄酮类化合物的合成代谢受多种因素的调控, 包括基因表达、酶活性、环境胁迫等。有研究表明, 盐胁迫处理下玉米、枸杞中黄酮类代谢物含量显著增加, 黄酮类代谢物的积累被认为是植物抵抗逆境胁迫的重要代谢途径之一^[6]。Zheng 等^[7]对 6 个青钱柳品种的抗炭疽病能力进行了评价, 发现‘五峰青钱柳’的抗病性与黄酮类化合物的合成量增加相关。由此可见, 黄酮类化合物在植物应对各种环境胁迫中具有重要的生理功能, 是植物耐受逆境胁迫的关键代谢物。

镉(Cd)是一种广泛存在于自然界中的重金属元素, 具有高毒性和生物积累性, 对生态环境和人类健康构成严重威胁。我国镉的点位超标率为 7.0%, 在无机污染物中居首位^[8]。镉对植物的毒害作用包括抑制种子发芽、生长发育、光合作用、矿质营养吸收和代谢过程等, 进而导致植物生长严重受阻甚至死亡^[9]。镉的高流动性使其容易被植物吸收, 从而影响植物代谢物质的合成, 特别是次生代谢物。如镉胁迫处理下雌性地钱的玉米素生物合成和嘌呤代谢水平降低; 雄性地钱则通过上调玉米素合成缓解叶绿素的降解, 以维持正常的光合作用^[10]。此外, 镉胁迫下水稻幼苗中的氨基酸生物合成、激素代谢、脂质相关代谢、苯丙氨酸代谢和苯丙烷类生物合成途径更加活跃, 以此提高水稻对镉胁迫的耐受性^[11]。然而, 镉胁迫对浙麦冬黄酮类化合物合成代谢的影响及其调控网络迄今尚不清楚。

本研究通过对浙麦冬进行不同浓度的镉胁迫处理, 明确镉胁迫对浙麦冬不同黄酮类化合

物合成代谢的影响规律, 揭示镉胁迫对浙麦冬黄酮类合成关键基因表达的调控特点, 进一步解析并筛选镉胁迫处理下浙麦冬黄酮类合成的关键调控网络, 以期在镉污染环境中药用植物的栽培和利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为浙麦冬 [*Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl], 收集自浙江省慈溪市。选取生长一致的 1 年生幼苗, 保留 5–6 片内叶, 叶长控制在 10–12 cm, 根部保留 4–5 cm。将幼苗转移到 1/2 Hoagland 溶液中, 每盆 12 株。缓苗 15 d 后, 对这些植株进行不同浓度的 Cd²⁺胁迫处理, 包括 0 mg/L 的对照组(Cd_0), 1 mg/L 的中镉胁迫组(Cd_M)和 10 mg/L 的高镉胁迫组(Cd_H), 每个处理重复 3 次。全程置于温室大棚中培养, 每 3 d 更换一次营养液。处理 1 个月, 收集根部并迅速冷冻于液氮中, -80 °C 保存以备后续分析使用。

1.2 代谢物组学分析

使用高灵敏度的 SCIEX QTRAP 6500+质谱平台(北京诺禾致源科技股份有限公司)对 Cd_0、Cd_M 和 Cd_H 进行类靶向代谢组学研究。利用京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)对鉴定到的代谢物进行功能和代谢途径注释, 使用单变量分析 *t* 检验, 确定统计显著性(*P* 值)。当 $x/n > y/n$ 时, 认为该代谢途径富集; 当代谢途径的 $P < 0.05$ 时, 认为该代谢途径为显著富集。基于偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)模型进行差异代谢物筛选, 条件设置为投影变量的重要性(variable importance in the projection, VIP) > 1、 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ 。使用 R 包 ggplot2

绘制火山图, 采用 \log_2 fold change 作为横轴, 并设置纵向阈值线 $-\log_{10} P$ -value。使用 TBtools 软件绘制黄酮类代谢物在不同镉胁迫处理下的相对含量表达热图, 并进行聚类分析。

1.3 基因相对表达分析

基于不同镉胁迫处理下的浙麦冬的转录组数据 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa/>, GSA 登录号: CRA008254), 对原始测序数据进行质控, 使用 Trinity (v2.6.6) 软件对 clean reads 进行拼接, 以构建参考转录组序列。利用 BUSCO 软件对拼接得到的 trinity.fasta、unigene.fa 以及 cluster.fasta 文件进行拼接质量评估, 之后采用 RSEM 软件对参考序列进行比对, 并将获得的 read counts 转换为每千个碱基的转录每百万映射读取的片段值 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM) 值以进行标准化处理。借助 DESeq2 (1.20.0) 进行组间的差异表达分析, $P < 0.05$ 且 $|\log_2$ fold change > 1 被设定为显著差异表达的阈值。使用非冗余蛋白序列数据库 (non-redundant protein sequence database, Nr)、非冗余核酸序列数据库 (non-redundant nucleotide sequence database, Nt)、蛋白家族数据库 (protein families database, Pfam)、KEGG、基因本体 (gene ontology, GO) 对基因进行注释, 采用 KOBAS (v2.0.12) 软件对差异基因集进行 KEGG 通路富集分析。使用 TBtools 软件绘制黄酮类合成相关基因在不同镉胁迫处理下的相对含量表达热图, 并进行聚类分析。

1.4 基因与代谢物相对表达量的相关性分析

使用转录组获取的基因表达数据以及代谢组学获取的代谢物相对丰度数据, 首先对子集数据分别进行正态分布检测, 选择 Spearman 相关性分析计算基因表达与代谢物丰度之间的相关性, 选择差异显著的基因及代谢物 ($P < 0.05$), 借助 R 语言中的 corrplot 包可视化相关性矩阵。使用 Cytoscape 绘制基因-代谢物网

络调控图, 节点分别表示基因和代谢物, 边表示它们之间的相关性。

1.5 统计分析

数据分析采用 SPSS 19.0 (IBM) 软件中的单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 进行。基于 Benjamini-Hochberg 校正后 $P < 0.05$ 和 $|\log_2$ fold change > 1 的标准筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并以 $P < 0.05$ 和 VIP > 1 的标准筛选差异代谢物 (differential accumulated metabolites, DAMs)。在 $P < 0.05$ 水平上, 不同处理组之间的显著性差异以不同小写字母表示。

2 结果与分析

2.1 不同镉浓度胁迫处理后浙麦冬代谢物差异分析

对浙麦冬进行中镉胁迫 (1 mg/L, Cd_M) 和高镉胁迫 (10 mg/L, Cd_H), 并将不添加镉 (0 mg/L, Cd_0) 作为对照。培养 30 d 后, 利用液相色谱-串联质谱联用法对不同镉胁迫浓度下根系中代谢物进行检测, 并以 VIP > 1 、 $P < 0.05$ 且 $|\log_2$ fold change > 1 为条件, 筛选不同处理间的差异代谢物。结果显示, 检测到的差异代谢物主要涉及全局和概述图谱 (global and overview maps)、氨基酸代谢 (amino acid metabolism)、碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 以及次生代谢物合成 (biosynthesis of other secondary metabolites) 等生化途径 (图 1A)。不同组别差异代谢物韦恩图分析显示, 中镉胁迫和对照比较组 (Cd_M vs. Cd_0) 与高镉胁迫和对照比较组 (Cd_H vs. Cd_0) 中共有 124 种差异代谢物, Cd_M vs. Cd_0 比较组中特有差异代谢物有 59 种, Cd_H vs. Cd_0 比较组中特有差异代谢物共计 99 种 (图 1B)。代谢组火山图结果表明, Cd_H vs. Cd_0 与 Cd_M vs. Cd_0 上调或下调差异代谢物的数量及差异倍数存在明显差异, 提示不同镉胁迫浓度对差异代谢物的产生有显著影响 (图 1C)。

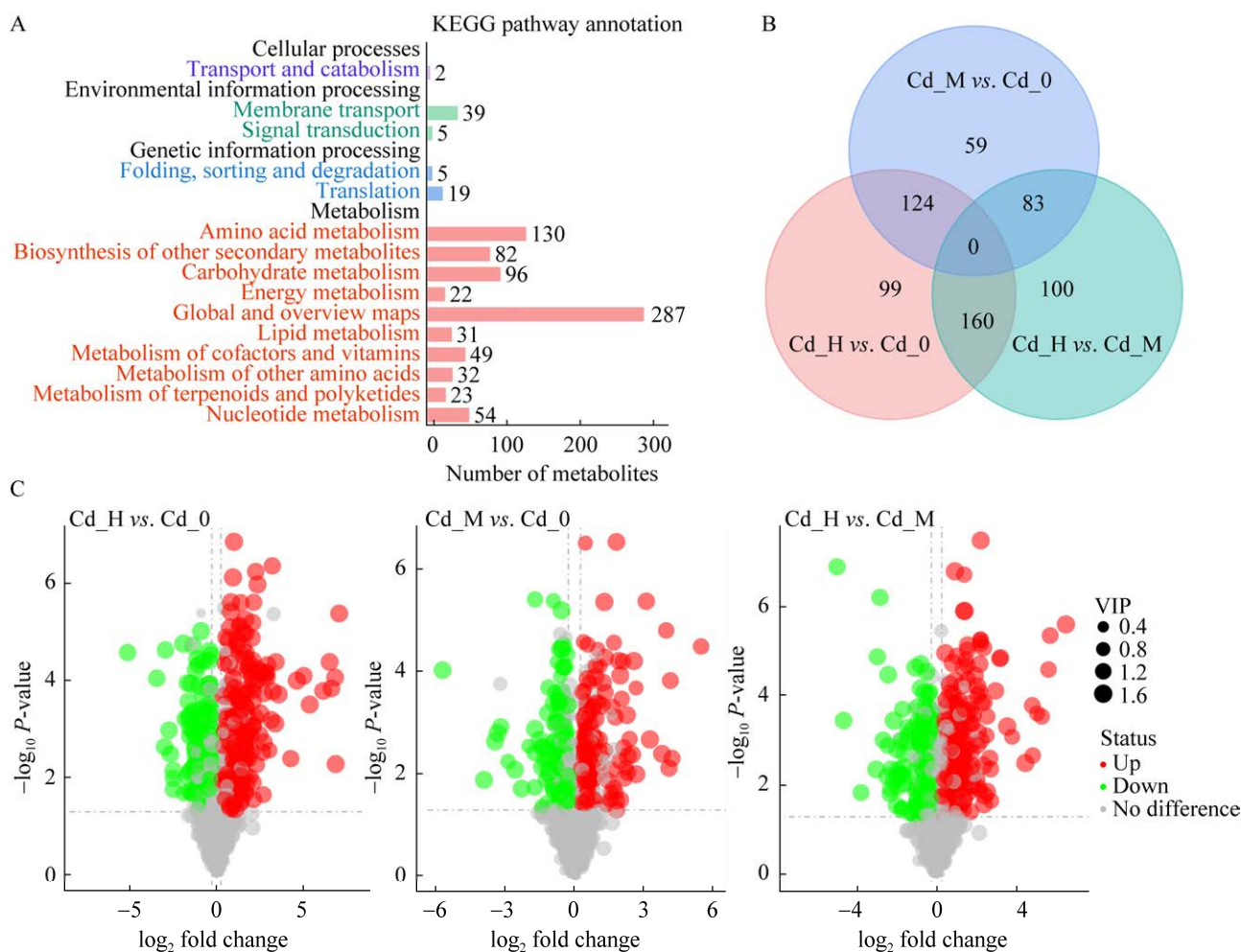


图1 不同浓度镉胁迫处理后差异代谢物统计 A: KEGG 通路注释; B: 差异代谢物韦恩图分析; C: 差异代谢物火山图分析。横坐标表示代谢物在不同分组中的差异倍数变化(\log_2 fold change), 纵坐标表示差异显著性水平($-\log_{10} P$ -value)。Cd_0、Cd_M 和 Cd_H 分别表示对照组(0 mg/L Cd^{2+})、中镉胁迫组(1 mg/L Cd^{2+})和高镉胁迫组(10 mg/L Cd^{2+})。

Figure 1 Statistics of differential expression of metabolites after Cd stress at different concentrations. A: KEGG pathway annotation; B: Venn diagram analysis of differential metabolites; C: Volcano plot analysis of differential accumulated metabolites. Cd_0, Cd_M, and Cd_H represent the control group at 0 mg/L Cd^{2+} , medium cadmium stress at 1 mg/L Cd^{2+} , and high cadmium stress at 10 mg/L Cd^{2+} , respectively.

对差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析显示(图 2), 在 Cd_M vs. Cd_0 比较组中, 排名前 5 的富集通路包括: 黄酮和黄酮醇生物合成(flavone and flavonol biosynthesis)、玉米素生物合成(zeatin biosynthesis)、抗坏血酸和醛酸代谢(ascorbate and aldarate metabolism)、异黄

酮生物合成(isoflavonoid biosynthesis)以及半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)。而在 Cd_H vs. Cd_0 比较组中, 排名前 5 的富集通路包括: 淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、半乳糖代谢(galactose metabolism)、嘌呤代谢(purine metabolism)、氨基糖

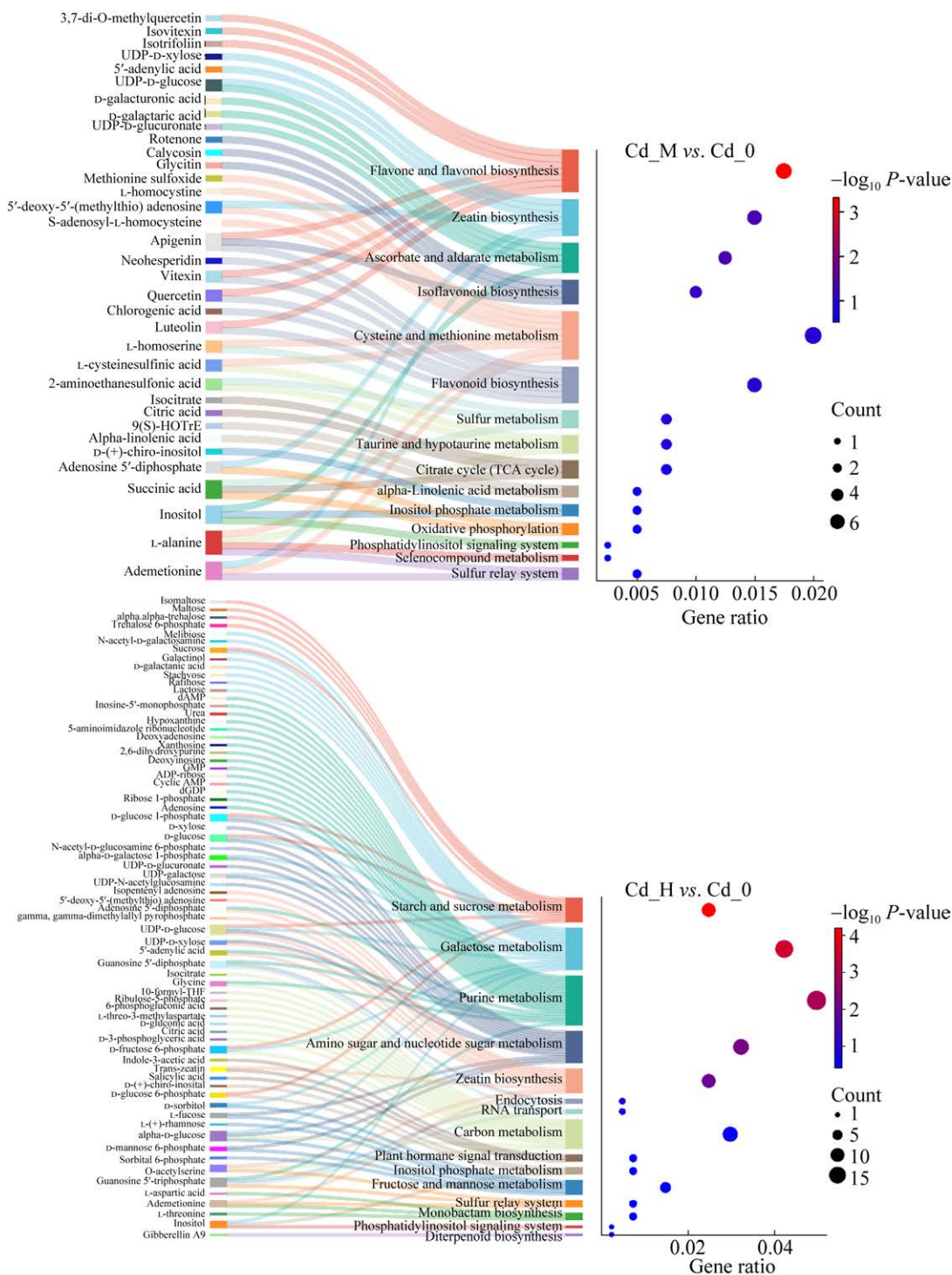


图 2 KEGG 富集桑基图 Cd₀、Cd_M 和 Cd_H 分别表示对照组(0 mg/L Cd²⁺)、中镉胁迫组(1 mg/L Cd²⁺)和高镉胁迫组(10 mg/L Cd²⁺)。点的颜色代表超几何检验的 *P*-value 值, 点的大小代表相应通路中差异代谢物的数目。

Figure 2 KEGG enrichment bubble analysis. Cd₀, Cd_M, and Cd_H represent the control group at 0 mg/L Cd²⁺, medium cadmium stress at 1 mg/L Cd²⁺, and high cadmium stress at 10 mg/L Cd²⁺, respectively. The color of the points represented the *P*-value from the hypergeometric test, and the size of the points represented the number of differential accumulated metabolites in the corresponding pathway.

和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)以及玉米素生物合成(zeatin biosynthesis)。其中, Cd_M vs. Cd_0 比较组中黄酮和黄酮醇生物合成达到差异极显著水平, 差异代谢物包括木犀草素(luteolin)、异三叶苷(isotrifoliin)、槲皮素(querctin)、牡荆苷(vitexin)、异牡荆苷(isovitexin)、3,7-二-O-甲基槲皮素(3,7-di-O-methylquerctin)、芹菜素(apigenin)、绿原酸(chlorogenic acid)、槲皮素(querctin)和新橙皮苷(neohesperidin)。

2.2 黄酮类化合物在镉胁迫处理后差异分析

黄酮类化合物是浙麦冬最主要的次生代谢物, 本研究中共检测到 110 种黄酮类化合物。如图 3A 所示, 不同浓度镉处理后浙麦冬中黄酮总含量显著上升, 中镉胁迫(Cd_M)和高镉胁迫(Cd_H)后根系中黄酮总含量分别上升至对照(Cd_0)的 1.08 倍和 1.77 倍。将所有黄酮类化合物按照类别分为黄酮类(flavones)、黄烷醇类(flavanols)、黄酮醇类(flavonols)、黄酮和黄酮醇类衍生物(flavones and flavonols)、黄烷酮类(flavanones)、异黄酮类(isoflavonoids)、查耳酮和二氢查耳酮类(chalcones and dihydrochalcones)以及花青素类(anthocyanins)。对比分析显示, 黄酮类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类衍生物以及花青素类在中镉胁迫(Cd_M)和高镉胁迫(Cd_H)处理下含量变化均达显著水平($P < 0.05$), 其中, 花青素类、黄酮类以及黄酮和黄酮醇类衍生物在高镉胁迫后依次上调至对照的 2.21、1.92、1.87 倍(图 3B)。此外, 黄酮和黄酮醇类衍生物的总相对含量显著高于其他各类黄酮类代谢物。

进一步按照相对含量变化对黄酮类化合物进行聚类分析, 结果显示, 这些代谢物在镉胁迫后的变化模式呈现 4 类不同的趋势(I, II, III, IV), 分别包含 48、6、16、40 种黄酮类化合物

(图 3C)。对比发现, 只有第 II 类中的代谢物在镉胁迫处理后(Cd_M 和 Cd_H)相对含量明显下降, 而第 I、III 和 IV 类的代谢物在镉胁迫后均有不同程度的上升。其中, 第 I 类和第 III 类黄酮类代谢物在高镉胁迫(Cd_H)条件下相对含量显著增加, 第 III 类在中镉胁迫(Cd_M)处理后黄酮类代谢物相对总量明显低于对照组及高镉胁迫(Cd_H)处理; 第 IV 类在中镉胁迫(Cd_M)条件下所有黄酮类代谢物相对含量增加, 但在高镉胁迫(Cd_H)下含量却有所下降, 提示这些化合物在不同浓度镉胁迫后可能存在不同的调控模式。

2.3 黄酮合成途径相关基因对镉胁迫处理的响应

为探讨浙麦冬在不同镉浓度胁迫下黄酮积累的机制, 对黄酮类化合物合成途径的相关基因进行表达模式分析。以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 为条件共筛选到 4 类关键酶显著差异表达, 包括苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)和查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)(图 4)。热图聚类分析显示, 在 17 个 PAL 基因中, 14 个在镉胁迫后表达量明显上调, 包括 Cluster-21637.103406、Cluster-21637.68113、Cluster-21637.68116、Cluster-21637.78953、Cluster-21637.75504、Cluster-21637.80785、Cluster-21637.75602、Cluster-21637.75054、Cluster-21637.69657、Cluster-21637.84128、Cluster-21637.75824、Cluster-21637.86589、Cluster-21637.80178 和 Cluster-21637.81565。在 22 个 4CL 基因中, 14 个基因(Cluster-4843.1、Cluster-4843.0、Cluster-21637.50110、Cluster-21637.62637、Cluster-6509.0、Cluster-21637.80198、Cluster-21637.12519、Cluster-8719.0、Cluster-21637.59938、Cluster-21637.8244、Cluster-21637.90648、Cluster-21637.5012、Cluster-

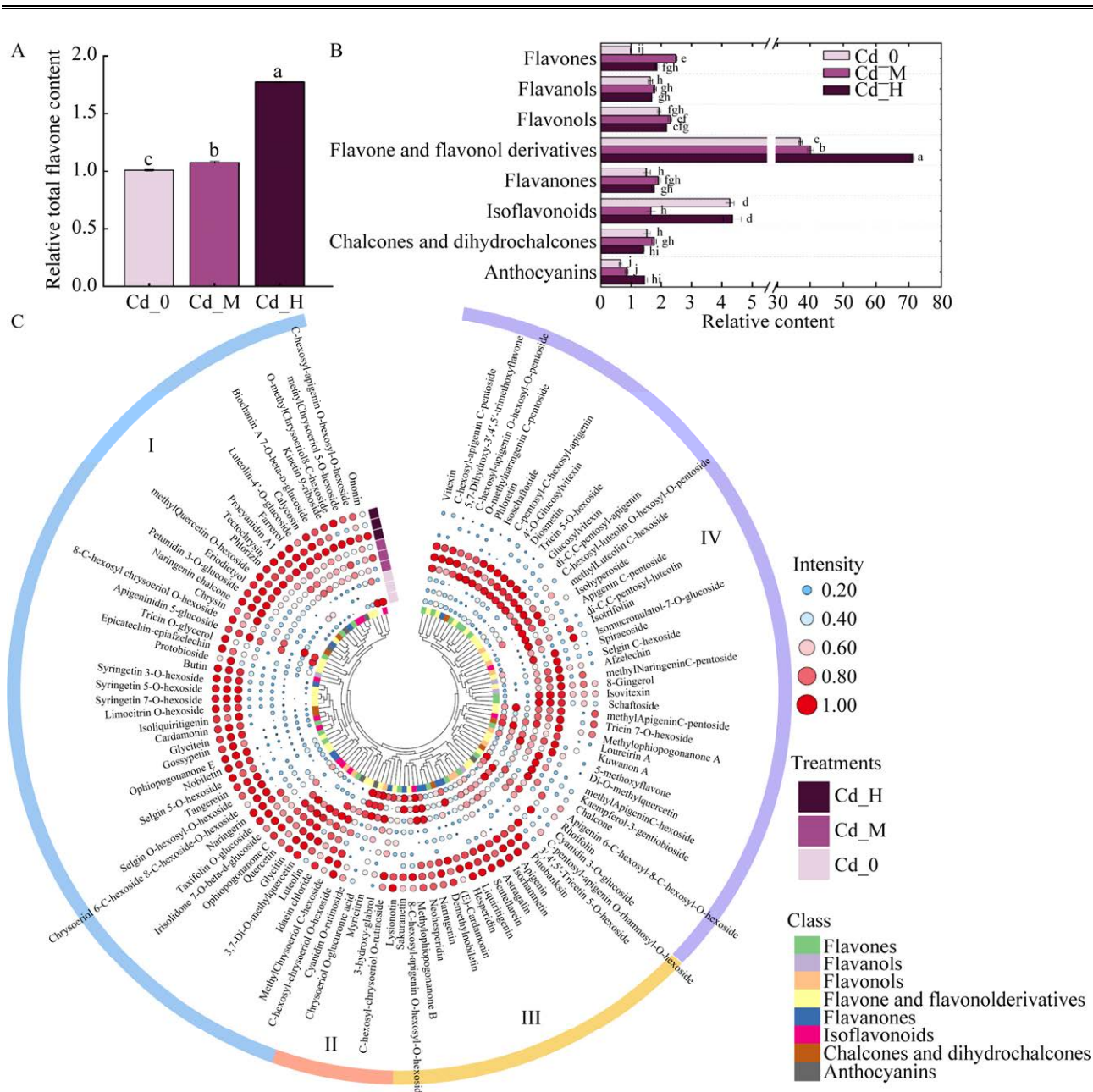


图 3 镉胁迫下黄酮类化合物差异分析 A: 黄酮类化合物的相对总含量; B: 各类黄酮化合物的相对含量, Cd_0 处理下的黄酮相对含量设为 1; C: 代谢物相对含量的热图分析。Cd_0、Cd_M 和 Cd_H 分别表示对照组(0 mg/L Cd²⁺)、中镉胁迫组(1 mg/L Cd²⁺)和高镉胁迫组(10 mg/L Cd²⁺)。不同小写字母代表差异显著水平(P<0.05)。分类包括黄酮类、黄烷醇类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类衍生物、黄烷酮类、异黄酮类、查耳酮和二氢查耳酮类以及花青素类。热图中的点颜色和大小表示相对表达量的高低。

Figure 3 Differential analysis of flavonoids under cadmium stress. A: Relative total content of flavonoids; B: Relative content of different flavonoid categories, with the relative content of flavones under Cd_0 treatment set to 1; C: Heatmap analysis of relative metabolite content. Different lowercase letters indicate significant level (P<0.05). Cd_0, Cd_M, and Cd_H represent the control group at 0 mg/L Cd²⁺, medium cadmium stress at 1 mg/L Cd²⁺, and high cadmium stress at 10 mg/L Cd²⁺, respectively. The categories include flavones, flavanols, flavonols, flavone and flavonol derivatives, flavanones, isoflavonoids, chalcones and dihydrochalcones, and anthocyanins. The color and size of the dots in the heatmap represent the levels of relative expression.

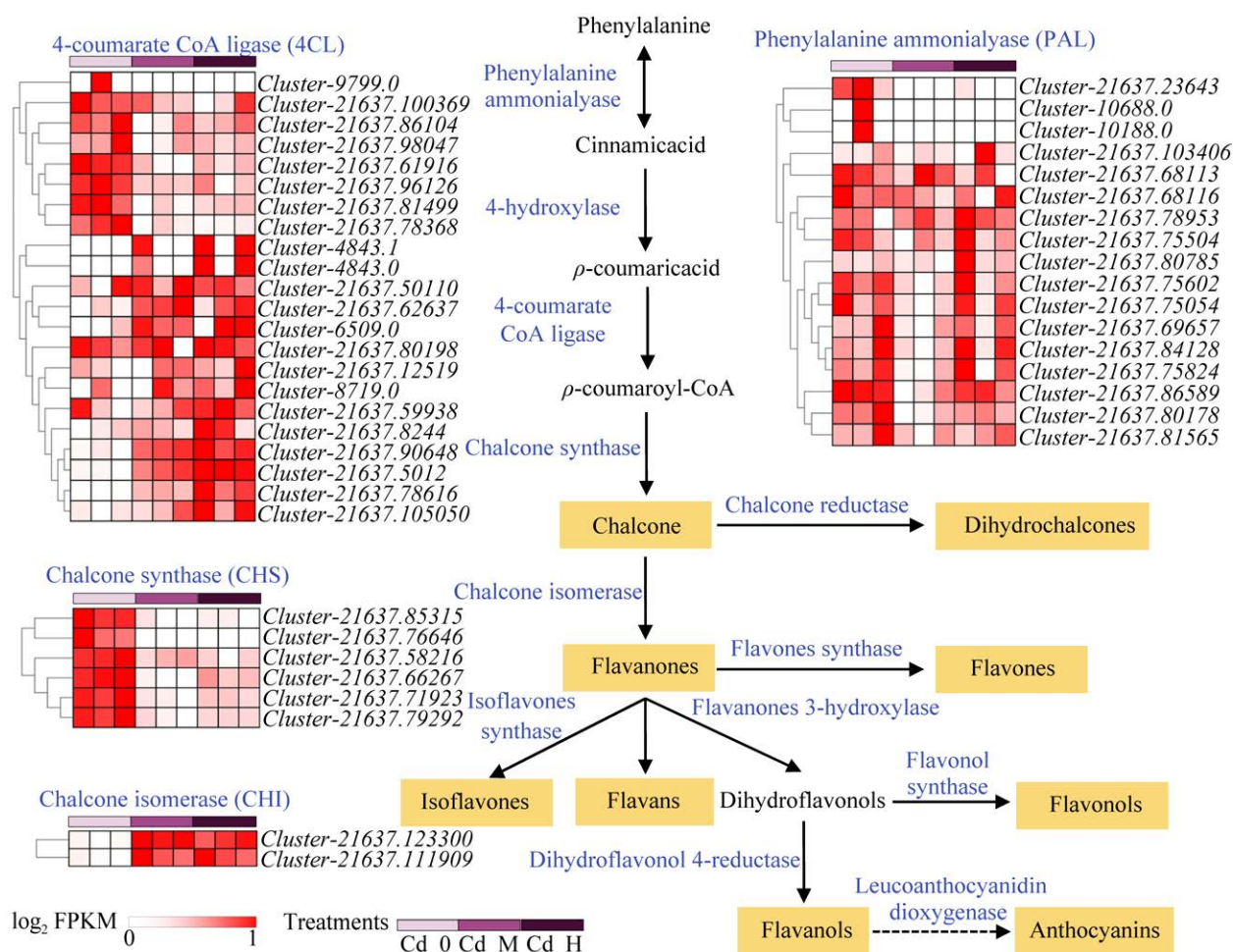


图4 黄酮类化合物合成相关基因表达分析 热图分析展示了不同镉浓度胁迫处理条件下,参与黄酮生物合成途径中各关键步骤基因表达情况。图中不同深浅的紫色表示不同浓度镉胁迫处理,红色代表基因高表达,白色代表基因低表达。

Figure 4 Analysis of gene expression related to flavonoid biosynthesis. The heatmap analysis illustrates the expression levels of genes involved in various steps of the flavonoid biosynthesis pathway under different cadmium stress treatments. Different shades of purple represent varying levels of cadmium stress, with red indicating high gene expression and white indicating low gene expression.

21637.78616 和 Cluster-21637.105050)在镉胁迫后表达量上调,中镉胁迫和高镉胁迫后平均上调 1.48 倍和 1.90 倍。同时在镉胁迫后,2 个 CHI 编码基因均呈现上调变化趋势,其中,上调倍数最大的是 Cluster-21637.111909,中镉胁迫和高镉胁迫处理后分别上调 8.24 倍和 8.44 倍;而 CHS 基因则表现出下调趋势。据此推测,在镉胁迫处理后,表达上调的 30 个基因可能在黄酮

类代谢物的积累中起到了关键作用。

2.4 黄酮合成相关基因与代谢物相关性分析

为进一步挖掘与黄酮合成紧密关联的重要代谢物和关键基因,对黄酮类所有代谢物和显著上调表达的差异基因进行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为条件,最终共筛选到 12 个差异表达基因与 38 种代谢物显著关联(图 5),其中 5 个差

异基因显著上调, 包括 CHI 类基因(*Cluster-21637.123300*、*Cluster-21637.111909*)、4CL 类基因(*Cluster-21637.62637*、*Cluster-21637.90648*、*Cluster-21637.5012*), 显著正相关的代谢物包括异黄酮类的异三叶苷(isotrifoliin)、二-C,C-戊糖基-木犀草素(di-C,C-pentosyl-luteolin)、槲皮素-4-O- β -D-葡萄糖苷(spiraeoside)、木犀草素(luteolin)、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷(luteolin-4'-O-glucoside)、黄蜡素(tectochrysin)、白杨素(chrysin)、夏佛塔苷(schaftoside)、异牡荊苷(isovitexin)、牡荊素葡萄糖苷(glucosylvitexin); 黄酮醇类的金丝桃甙(isohyperoside)、槲皮素(querctin)、丁香素 5-O-己糖苷(syringetin 5-O-hexoside)、丁香素 7-O-己糖苷(syringetin 7-O-hexoside)、丁香素 3-O-己糖苷(syringetin 3-O-hexoside)、3,7-二-O-甲基槲皮素(3,7-di-O-methylquercetin)、甲基槲皮素 O-己糖苷(methylquercetin O-hexoside); 黄酮和黄酮醇类

的甲基黄酮醇 C-己糖苷(methylchrysoeriol C-hexoside)、O-甲基黄酮醇 8-C-己糖苷(O-methylchrysoeriol 8-C-hexoside)、柠檬素 O-己糖苷(limocitrin O-hexoside); 黄烷醇类的 8-姜酚(8-gingerol)、阿夫儿茶精(afzelechin); 黄酮类的圣草酚(eriodictyol)、紫杉醇 O-葡萄糖苷(taxifolin O-glucoside)、漆黄素(butin)、杜鹃素(farrerol); 异黄酮类的麦冬酮 C(ophiopogonanone C)、麦冬酮 E(ophiopogonanone E)、毛蕊异黄酮(calycosin)、异木兰苷-7-O-葡萄糖苷(isomucronulatol-7-O-glucoside)、生物异黄酮 A7-O- β -D-葡萄糖苷(biochanin A 7-O-beta-D-glucoside); 查耳酮类和二氢查耳酮类的柚皮素查耳酮(naringenin chalcone)、根皮苷(phlorizin); 花青素类的矮牵牛素 3-O-葡萄糖苷(petunidin 3-O-glucoside)、原花青素 A1(procyanidin A1)和激动素 9-核糖苷(kinetin 9-riboside)。

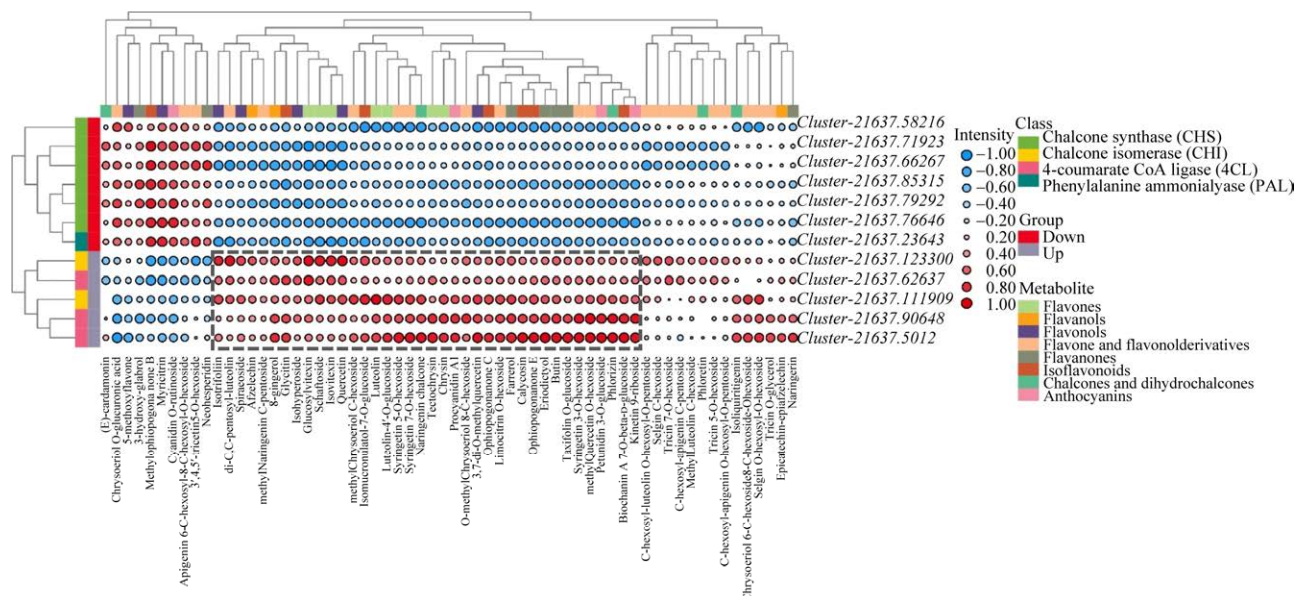


图 5 黄酮合成相关基因与代谢物的 Spearman 相关性分析 相关性分析展示了在镉胁迫条件下黄酮合成相关基因与代谢物之间的相关系数。图中的不同颜色块表示不同的代谢物、类别或组别。红色表示相关系数较高, 蓝色表示相关系数较低。

Figure 5 Spearman correlation analysis of flavonoid synthesis-related genes and metabolites under cadmium stress. The correlation analysis shows the correlation coefficients between flavonoid synthesis-related genes and metabolites under cadmium stress. Different color blocks represent different metabolites, classes, or groups. Red indicates a high correlation coefficient, while blue indicates a low correlation coefficient.

2.5 镉胁迫下黄酮合成基因与代谢物调控网络分析

对上述显著关联的差异基因和代谢物构建基因-代谢物调控网络,结果显示(图 6),在镉胁迫处理后显著上调的 5 个差异基因与代谢物相关系数最高的组合依次为 0.96 (*Cluster-21637.5012*; 圣草酚, eriodictyol)、0.95 (*Cluster-21637.111909*; 木犀草素, luteolin)、0.93 (*Cluster-21637.123300*; 槲皮素, quercetin)、0.92 (*Cluster-21637.90648*; 甲基槲皮素 O-己糖苷, methylquercetin O-hexoside) 和 0.90 (*Cluster-21637.123300*; 二-C,C-戊糖基-木犀草素, di-C,C-pentosyl-luteolin)。具体而言, 4CL (*Cluster-21637.5012*)与 10 种代谢物的相关系数大于 0.90, 其中与圣草酚(eriodictyol)、花青素类的矮牵牛素 3-O-葡萄糖苷(petunidin 3-O-glucoside)、甲基槲皮素 O-己糖苷(methylquercetin O-hexoside)和生物异黄酮 A7-O-β-D-葡萄糖苷(biochanin A 7-O-beta-D-glucoside)之间的相关性系数均大于 0.93。除此之外, 1 个 CHI 基因

(*Cluster-21637.123300*)与牡荆素葡萄糖苷(glucosylvitexin)以及 1 个 4CL 基因(*Cluster-21637.90648*)与根皮苷(phlorizin)和激动素 9-核糖苷(kinetin 9-riboside)的相关系数也超过 0.90。这表明在镉胁迫下, 这些上调的基因与特定代谢物之间存在显著的正相关关系, 提示其在镉胁迫下黄酮积累中发挥的重要作用。

3 讨论

浙麦冬(*O. japonicus*)作为浙江省独有的珍贵药用植物, 以其卓越的养阴生津、润肺清心的功效和丰富的生物活性成分在中医药领域中具有极高的药用价值和广泛的应用前景。已有研究表明, 逆境胁迫在一定程度上可以促进黄酮类化合物的合成。例如, 干旱胁迫诱导柴胡叶片中黄酮类化合物和根中柴胡皂苷的生物合成^[12]; Jiao 等通过转录组学和代谢组学揭示了高粱根通过调节黄酮类化合物的生物合成途径来应对镉胁迫^[13]。本研究采用中镉胁迫(1 mg/L, Cd_M)

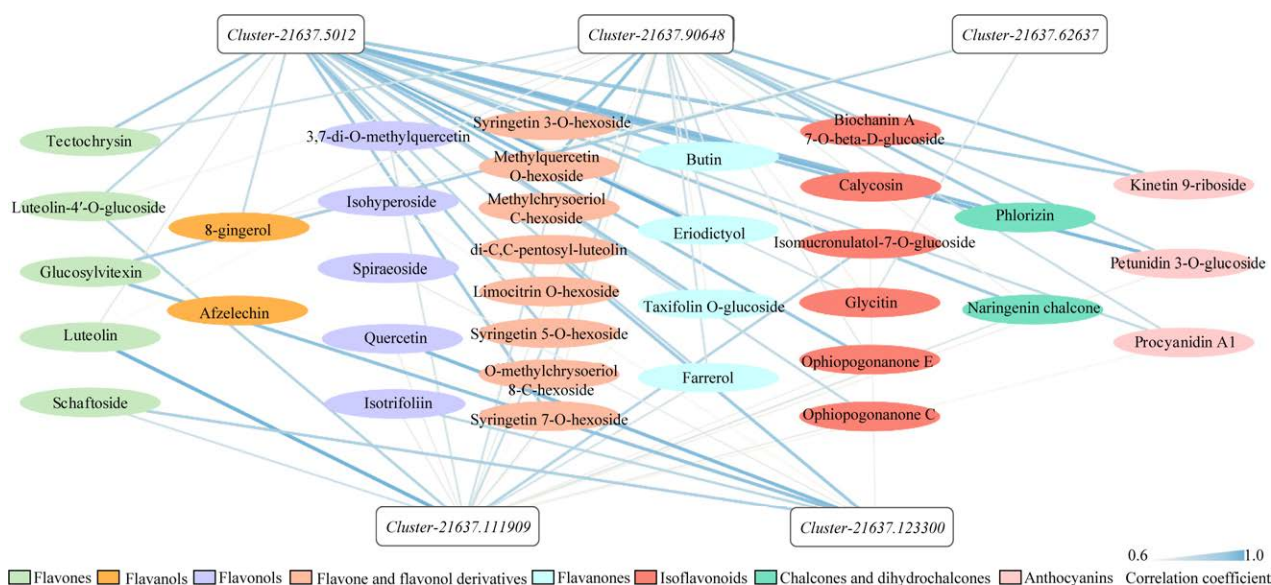


图 6 基因与黄酮代谢物调控网络分析 线条的粗细表示 2 个节点之间相关系数的大小。

Figure 6 Analysis of the regulatory network between genes and flavonoid metabolites. The thickness of the lines represents the magnitude of the correlation coefficient between two nodes.

和高镉胁迫(10 mg/L, Cd_H)这 2 种不同浓度的镉处理浙麦冬后, 其根系黄酮类化合物总含量积累显著增加, 且镉浓度越高, 黄酮类化合物含量越高, 代谢组学分析显示显著上升的代谢物包括多种异黄酮类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类、黄酮类、查耳酮和二氢查耳酮类、青素类以及黄烷酮类等, 差异倍数排名前 3 种物质分别为花青素类、黄酮类以及黄酮和黄酮醇类衍生物, 在高镉胁迫后依次上调至对照的 2.21、1.92、1.87 倍。据报道, 镉胁迫会导致植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的显著升高, 进而引发严重的氧化应激反应, 而黄酮类化合物可以清除 ROS、减轻氧化损伤, 从而提高植物对镉胁迫的耐受性^[14]。例如, 玉米幼苗中黄酮类化合物通过调节活性氧(ROS)的稳态, 提高其抗盐胁迫能力^[15]。在拟南芥中过表达南极苔藓的黄酮合酶可增强其黄酮生物合成途径并赋予拟南芥抵御干旱胁迫和 UV-B 辐射的能力^[16]。除此之外, 植物黄酮类化合物还具有多种生物学功能, 如在紫外线辐射下保护植物细胞免受 DNA 损伤^[17]等。本研究的结果显示, 在中镉和高镉胁迫条件下, 浙麦冬中的黄酮类化合物相对含量显著上升, 包括花青素类、黄酮类以及黄酮和黄酮醇类衍生物, 尤其是在高镉胁迫条件下, 这一现象更加显著, 表明黄酮类代谢物的积累是浙麦冬应对镉胁迫的重要生理反应。

结合转录组学分析, 本研究鉴定出多种在镉胁迫处理后显著上调的基因, 包括 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)编码基因、查尔酮合成酶(CHS)编码基因、查尔酮异构酶(CHI)编码基因和苯丙氨酸解氨酶(PAL)编码基因。其中, PAL 作为苯丙素类代谢途径的第一步酶, 催化苯丙氨酸转化为肉桂酸^[18], 且高表达的 PAL 基因促进多种植物总黄酮含量的积累^[18]。在鉴定出的

17 个 PAL 基因中, 有 14 个基因在镉胁迫后显著上调表达。4CL 负责将 4-香豆酸转化为其辅酶 A 酯, 是合成多种次级代谢物的初始步骤之一^[19], 14 个 4CL 基因在镉胁迫下其表达量明显上调。盐胁迫处理下 4CL 基因的上调有助于增加黄酮类化合物的积累, 进而增强核桃的抗盐胁迫能力^[20]; 这与 Chen 等在烟草研究中的发现相符, 即黄酮类化合物的合成量增加与植物抗性的增强密切相关^[21]。由此推测, 浙麦冬中的 14 个 PAL 及 14 个 4CL 基因在总黄酮积累中发挥重要作用。同样, CHI 基因的显著上调在此过程中也扮演了重要角色, 该类基因负责将查尔酮异构化为黄烷酮, 为后续的黄酮、黄烷醇等化合物的形成提供基础^[22], 这不仅保证了黄酮类化合物的多样性, 也进一步促进了黄酮类化合物的积累。然而, CHS 基因在镉胁迫下的表达则呈现下调趋势, CHS 是黄酮类合成的限速酶^[23], 其基因表达下调与总黄酮量上升看似矛盾, 但实际上可能是由于其他酶的上调或代谢途径的重新分配所致。在白菊中的研究发现, 花发育过程中 CHS 转录本的减少不会影响黄酮积累水平^[24]。据此认为在镉胁迫处理下, 上调表达的 4CL、CHI 和 PAL 在促进黄酮类化合物的积累过程中发挥重要作用。

为了深入解析镉胁迫下浙麦冬黄酮积累的调控机制, 本研究构建了基因-代谢物调控网络。结果表明, 4CL、CHI 等基因与多种黄酮类代谢物含量之间存在显著的正相关关系。具体而言, 1 个 4CL 编码基因(Cluster-21637.5012)与 10 种代谢物的相关系数大于 0.90, 其中与圣草酚、矮牵牛素 3-O-葡萄糖苷、甲基槲皮素 O-己糖苷和生物异黄酮 A7-O-β-D-葡萄糖苷之间的相关性系数均大于 0.93。1 个 CHI 编码基因(Cluster-21637.123300)与牡荆素葡萄糖苷(glucosylvitexin)以及 4CL 编码基因(Cluster-

21637.90648)与根皮苷(phlorizin)和激动素 9-核糖苷(kinetin 9-riboside)的相关系数也超过 0.90。圣草酚作为黄酮类代谢物的前体,在植物体内黄酮类化合物的合成途径中起着关键作用,可促进其他功能性黄酮类化合物(如槲皮素)的合成,亦可通过反馈调节相关代谢通路中的基因表达,增强植物的黄酮类代谢能力^[25],激动素 9-核糖苷作为一种植物激素类化合物,可能在调控植物生长和抗逆性方面发挥重要作用^[26]。槲皮素是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物,具有抗氧化、抗癌、抗炎等多种药理活性,对于植物在逆境条件下的生长和发育具有重要意义^[27]。综上所述,4CL (*Cluster-21637.5012*、*Cluster-21637.90648*)、CHI (*Cluster-21637.123300*)与多种黄酮类代谢物具有极强的显著正相关性,提示这些基因通过调控黄酮类代谢物的合成,促进了镉胁迫处理下总黄酮量的积累,增强了浙麦冬的抗逆能力。

4 结论

本研究通过代谢组学与转录组学的联合分析,探讨了镉胁迫对浙麦冬黄酮类化合物积累及其生物合成途径的影响。随着镉胁迫浓度的增加,浙麦冬根系中黄酮类化合物的含量显著提升,尤其在高浓度镉胁迫下,这一现象更为明显。显著上升的黄酮类代谢物包括异黄酮类、黄酮醇类、黄酮和黄酮醇类衍生物以及花青素类。同时,多个与黄酮类合成相关的关键基因(如 4CL、CHI、PAL)在镉胁迫后显著上调表达,表明这些基因在黄酮类化合物的合成和积累中起到重要作用。此外,基因-代谢物调控网络分析显示,4CL 和 CHI 基因与多种黄酮类代谢物之间存在显著的正相关性,提示它们通过调控黄酮类代谢物的合成,增强了浙麦冬对镉胁迫的耐受性,为镉污染环境中药用植物的栽培和利用提供了理论支持。

REFERENCES

- [1] 李小辉,袁名睿,陆礼和,梅双喜,杨增明,崔涛,董汛. 浙麦冬的化学成分研究[J]. 中草药, 2022, 53(2): 347-353.
- [2] LI XH, YUAN MR, LU LH, MEI SX, YANG ZM, CUI T, DONG X. Chemical composition of Zhejiang *Ophiopogon japonicus*[J]. Acupuncture Research, 2022, 53(2): 347-353 (in Chinese).
- [2] 朱海花,祝明,蒋慧莲,陈勇. 浙麦冬黄酮类成分指纹图谱及 2 种黄酮类化合物的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 85-88.
- [2] ZHU HH, ZHU M, JIANG HL, CHEN Y. HPLC fingerprints of flavonoids in *Ophiopogonis radix* of Zhejiang and quantitative analysis of two moisoflavonoids[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(7): 85-88 (in Chinese).
- [3] LIU Q, LU JJ, HONG HJ, YANG Q, WANG YT, CHEN XJ. *Ophiopogon japonicus* and its active compounds: a review of potential anticancer effects and underlying mechanisms[J]. Phytomedicine, 2023, 113: 154718.
- [4] WU H, WU ZX, WANG YH, DING J, ZHENG YL, TANG H, YANG L. Transcriptome and metabolome analysis revealed the freezing resistance mechanism in 60-year-old overwintering *Camellia sinensis*[J]. Biology, 2021, 10(10): 996.
- [5] RAO MJ, FENG BH, AHMAD MH, TAHIR UL QAMAR M, ASLAM MZ, KHALID MF, HUSSAIN S, ZHONG RM, ALI Q, XU Q, MA CJ, WANG LQ. LC-MS/MS-based metabolomics approach identified novel antioxidant flavonoids associated with drought tolerance in citrus species[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1150854.
- [6] 朱一剑,李秀壮,彭小锋,唐蓉萍,刘继超,马望龙,白麒麟. 黄酮类化合物在植物保护领域的研究进展[J]. 山东化工, 2024, 53(9): 110-113.
- [6] ZHU YJ, LI XZ, PENG XF, TANG RP, LIU JC, MA WL, BAI QY. Research progress of flavonoids in the field of plant protection[J]. Shandong Chemical Industry, 2024, 53(9): 110-113 (in Chinese).
- [7] ZHENG XR, ZHANG MJ, QIAO YH, LI R, ALKAN N, CHEN JY, CHEN FM. *Cyclocarya paliurus* reprograms the flavonoid biosynthesis pathway against *Colletotrichum fructicola*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 933484.
- [8] 陈能场,郑煜基,何晓峰,李小飞,张晓霞. 《全国土壤污染状况调查公报》探析[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(9): 1689-1692.
- [8] CHEN NC, ZHENG YJ, HE XF, LI XF, ZHANG XX. Analysis of the report on the national general survey of soil contamination[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(9): 1689-1692 (in Chinese).
- [9] EL RASAFI T, OUKARROUM A, HADDIOUI A, SONG H, KWON EE, BOLAN N, TACK FMG, SEBASTIAN A, PRASAD MNV, RINKLEBE J. Cadmium stress in plants: a critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022, 52(5): 675-726.
- [10] 何静,易航,杨希,荣妹恬,王丽. 基于 LC-MS 技术对镉胁迫下地钱代谢组的性别响应差异研究[J]. 四

- 川大学学报(自然科学版), 2023, 60(4): 159-168.
- HE J, YI H, YANG X, RONG ST, WANG L. Study on gender response difference of *Marchantia polymorpha* metabolome under cadmium stress based on LC-MS technique[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2023, 60(4): 159-168 (in Chinese).
- [11] CHANG WX, WANG W, SHI ZS, CAO GD, ZHAO XC, SU XL, CHEN Y, WU JB, YANG Z, LIU CL, SHANG LG, CAI ZW. Comparative metabolomics combined with physiological analysis revealed cadmium tolerance mechanism in indica rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(20): 7669-7678.
- [12] YANG LL, YANG L, YANG X, ZHANG T, LAN YM, ZHAO Y, HAN M, YANG LM. Drought stress induces biosynthesis of flavonoids in leaves and saikosaponins in roots of *Bupleurum chinense* DC[J]. Phytochemistry, 2020, 177: 112434.
- [13] JIAO ZY, SHI YN, WANG JP, WANG ZF, ZHANG X, JIA XY, DU Q, NIU JT, LIU BC, DU RH, JI GS, CAO JF, LV P. Integration of transcriptome and metabolome analyses reveals sorghum roots responding to cadmium stress through regulation of the flavonoid biosynthesis pathway[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1144265.
- [14] DARYANAVARD H, POSTIGLIONE AE, MÜHLEMANN JK, MUDAY GK. Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2023, 72: 102350.
- [15] SHOMALI A, DAS S, ARIF N, SARRAF M, ZAHRA N, YADAV V, ALINIAEIFARD S, CHAUHAN DK, HASANUZZAMAN M. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance[J]. Plants, 2022, 11(22): 3158.
- [16] WANG HJ, LIU SH, WANG TL, LIU HW, XU XH, CHEN KS, ZHANG PY. The moss flavone synthase I positively regulates the tolerance of plants to drought stress and UV-B radiation[J]. Plant Science, 2020, 298: 110591.
- [17] FERREYRA MLF, SERRA P, CASATI P. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(3): 736-749.
- [18] MA DC, GUO YM, ALI I, LIN JR, XU YY, YANG M. Accumulation characteristics of plant flavonoids and effects of cultivation measures on their biosynthesis: a review[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 215: 108960.
- [19] EHLTING J, SHIN JJ, DOUGLAS CJ. Identification of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains[J]. The Plant Journal, 2001, 27(5): 455-465.
- [20] MA JY, ZUO DJ, ZHANG XD, LI HC, YE H, ZHANG NJ, LI MD, DANG M, GENG FD, ZHOU HJ, ZHAO P. Genome-wide identification analysis of the 4-coumarate: CoA ligase (4CL) gene family expression profiles in *Juglans regia* and its wild relatives *J. Mandshurica* resistance and salt stress[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 211.
- [21] CHEN XH, SU WL, ZHANG H, ZHAN YG, ZENG FS. *Fraxinus mandshurica* 4-coumarate-CoA ligase 2 enhances drought and osmotic stress tolerance of tobacco by increasing coniferyl alcohol content[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 155: 697-708.
- [22] ZHU JH, ZHAO W, LI RS, GUO D, LI HL, WANG Y, MEI WL, PENG SQ. Identification and characterization of *Chalcone* isomerase genes involved in flavonoid production in *Dracaena cambodiana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 616396.
- [23] ZHANG XB, ABRAHAN C, COLQUHOUN TA, LIU CJ. A proteolytic regulator controlling *Chalcone* synthase stability and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2017, 29(5): 1157-1174.
- [24] ZHU L, DING Y, WANG S, WANG Z, DAI L. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of CHS gene family members in *Chrysanthemum nankingense*[J]. Genes, 2022, 13(11): 2145.
- [25] ISLAM A, ISLAM MS, RAHMAN MK, UDDIN MN, AKANDA MR. The pharmacological and biological roles of eriodictyol[J]. Archives of Pharmacal Research, 2020, 43(6): 582-592.
- [26] BIELACH A, HRTYAN M, TOGNETTI VB. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(7): 1427.
- [27] SINGH P, ARIF Y, BAJGUZ A, HAYAT S. The role of quercetin in plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166: 10-19.