西北植物学报，2023，43(4)：0559－0568
Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.

doi：10.7606/j.issn.1000-4025.2023.04.0559 http://xbzwxb.alljournal.net

杂交兰及其花艺突变体中类黄酮成分差异的代谢-转录组联合分析

孔　兰[1,2]，林榕燕[1,2]，林　兵[1,2]，钟淮钦[1,2*]

（1 福建省农业科学院 作物研究所，福州 350013；2 福建省特色花卉工程技术研究中心，福州 350013）

摘　要：为探索杂交兰花艺突变体变异的分子机理，该研究以杂交兰‘玉凤’及其花艺突变体‘双艺金龙’为材料，利用靶向代谢组学和转录组学鉴定两者中类黄酮化合物含量差异及其相关通路上的差异表达基因。结果表明：(1)代谢组分析发现，杂交兰‘玉凤’和‘双艺金龙’花瓣中共检测到 271 种类黄酮代谢物，其中黄酮醇类和黄酮类代谢物的相对含量约占总类黄酮的 30%～50%；共检测到 38 个差异代谢物(15 个上调，23 个下调)；‘玉凤’中差异最高的代谢物二氢山奈酚-7-O-葡萄糖苷(黄酮醇类)含量是‘双艺金龙’的 124 444 倍，‘双艺金龙’中差异最高的代谢物 3,5,7,3′,4′-五羟基-5′-异戊二烯基黄酮(黄酮醇类)含量是‘玉凤’的 7 244 倍。(2)KEGG 分析显示，差异代谢物显著富集在类黄酮、黄酮和黄酮醇生物合成途径。其中，在类黄酮生物合成途径上，根皮苷、黄腐醇、二氢山奈酚、二氢杨梅素和表没食子儿茶素含量升高，柚皮苷和二氢槲皮素含量降低；在黄酮和黄酮醇生物合成途径上，三叶豆苷和槲皮素含量均下降。(3)转录组分析共筛选到 563 个差异表达基因，与‘玉凤’相比，‘双艺金龙’中有 220(39.1%)个基因上调表达，343(60.9%)个基因下调表达；KEGG 分析发现，与类黄酮生物合成相关的差异基因(*CCoAOMT*、*CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS*)被显著富集。(4)qRT-PCR 验证结果显示，‘双艺金龙’中类黄酮生物合成相关基因(*CHS2*、*CHS3*、*CHI*、*F3H*、*FLS*)以及转录因子基因 *HD-ZIP* 的表达量较‘玉凤’均显著下降，其表达量的变化趋势与代谢物含量的变化趋势一致。研究认为，类黄酮生物合成相关基因的低表达，使下游代谢物合成受阻，进而导致‘双艺金龙’花艺的产生；推测类黄酮生物合成途径中的基因可能是杂交兰花色变化的关键基因。

关键词：杂交兰；花艺；代谢组；转录组；类黄酮

中图分类号：Q946.8；Q789　　**文献标志码**：A

Integrated Metabolomics and Transcriptomics Analysis Reveals Differential Flavonoids Compounds of *Cymbidium* Hybrid and Its Mutant

KONG Lan[1,2], LIN Rongyan[1,2], LIN Bing[1,2], ZHONG Huaiqin[1,2*]

(1 Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2 Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

Abstract: In order to confirm the molecular basis underlying flower color variegation between *Cymbidium* hybrid 'Yufeng' and its mutant 'Shuangyijinlong', we used targeted metabolomics and transcriptomics to identify the differentially expressed metabolites (DEMs) and differentially expressed genes (DEGs) involved in flavonoid biosynthesis. The results showed that: (1) by using targeted metabolomics techniques, we identified 271 flavonoid metabolites, in which 30%－50% metabolites were flavonols and fla-

收稿日期：2022-11-18；**修改稿收到日期**：2023-04-03

基金项目：福建省自然科学基金(2022J01478)；福建省农业科学院青年英才项目(YC20210040，YC2019001)；‘5511’协同创新项目(XTCXGC2021016)；福建省种业创新与产业化工程(ZYCX-LY-202102)；特色花卉科技创新团队(CXTD2021010-2)

作者简介：孔　兰(1987－)，女，博士，助理研究员，主要从事观赏植物分子生物学研究。E-mail：konglan621@126.com

*通信作者：钟淮钦，硕士，副研究员，主要从事观赏植物种质资源评价与创新利用研究。E-mail：zhqeast@163.com

vonoid metabolites. A total of 38 DEMs (15 up-regulated, 23 down-regulated) were identified. Among these, the content of dihydrokaempferol-7-O-glucoside (flavonol) in 'Yufeng' was 124 444 times of which was in 'Shuangyijinlong', while the content of uralenol (flavonol) in 'Shuangyijinlong' was 7 244 times of which was in 'Yufeng'. (2) KEGG analysis showed that flavonoid biosynthesis, flavone and flavonol biosynthesis were significantly enriched. In flavonoid biosynthesis pathway, the contents of phlorizin, xanthohumol, dihydrokaempferol, dihydromyricetin and epigallocatechin all increased, the contents of naringin and dihydroquercetin decreased. In addition, the contents of trifolin and quercetin decreased in flavone and flavonol biosynthesis pathway. (3) By the transcriptome, a total of 563 DEGs were identified, 220 (39.1%) DEGs of which were up-regulated and 343 (60.9%) DEGs were down-regulated in the 'Yufeng' vs. 'Shuangyijinlong' comparison. KEGG analysis indicated that flavonoid biosynthesis-related DEGs (*CCoAOMT*, *CHS*, *CHI*, *F3H* and *FLS*) were found to be signiflcantly enriched. (4) QRT-PCR validation showed that the expression level of flavonoid biosynthesis-related DEGs (*CHS2*, *CHS3*, *CHI*, *F3H* and *FLS*) and transcription factor gene *HD-ZIP* were lower in 'Shuangyijinlong' than those in 'Yufeng'. In general, the expression of genes showed a same trend to the accumulation of metabolites, suggesting that the color change of 'Shuangyijinlong' might be attributed to the down-regulation of *CHS*, *CHI*, *F3H* and *FLS* that led to block the downstream metabolites synthesis. It is speculated that the genes involved in the flavonoids biosynthesis may be the key genes for the flower color variegation in *Cymbidium* hybrid.

Key words: *Cymbidium* hybrid; flower color mutant; metabolomics; transcriptomics; flavonoid

兰花是中国传统的十大名花之一,其'有花赏花、无花观叶'的特性深受消费市场的喜爱。随着市场需求量的上升,各类奇花、奇叶、奇型等兰花品种登上了兰市大舞台,促进了兰花品种多元化,这也对兰花品种创制提出了新挑战。艺兰是经原生种变异或在人工选育过程中获得的一批可稳定遗传的新品种,根据观赏部位的不同可分为两大类,即叶艺品种和花艺品种,其观赏和经济价值显著提高[1-3]。传统叶艺品种又称叶色突变体,是指在兰花叶片上出现白色或黄色或深绿色的条纹或斑块的一种变异品种[4]。目前在铁皮石斛[1]、文心兰[5]、蝴蝶兰[6]、春剑[7]、墨兰[8-9]、建兰[10-11]和杂交兰[12-13]等兰科植物中获得了多种类型的叶艺兰品种,普遍认为这些突变体是由于基因突变或基因表达模式改变,影响了叶绿体发育、叶绿素合成和降解、花青素代谢等最终导致叶艺的产生[14-15]。当叶艺的表现形态(爪艺、覆轮艺、中透艺、水晶艺等)呈现在花瓣上时可称之为花艺,其变异本质与叶艺相似,往往与类黄酮、类胡萝卜素、叶绿素的种类、成分和含量等因素有关[4]。在中国兰中广泛存在多种类型的花艺突变体,但尚未见其变异机理相关的研究报道。

杂交兰(*Cymbidium* hybrid)为中国兰与大花蕙兰杂交选育而来的一类兰花新品种[16]。目前,杂交兰中有关'艺'的研究也主要集中在叶艺突变体方面[12-13],而对花艺突变体方面的相关研究空白。挖掘杂交兰更高的观赏价值,培育花叶双艺的新品种,有利于提高杂交兰在花卉市场的竞争力。前期本课题组在杂交兰品种'玉凤'组培过程中发现了 1 株叶片、花瓣及萼片顶端具有白色半透明斑纹(爪艺)的组培苗,其繁殖后代种植多年后,叶片、花瓣和萼片的爪艺性状可稳定遗传[17]。然而,引起颜色变异的分子基础尚不确定。本研究以'玉凤'及其突变体'双艺金龙'(萼片和花瓣边缘出现爪艺)为试验材料,利用靶向代谢组学和转录组学进行类黄酮差异代谢物和差异表达基因的分析,初步探索爪艺花瓣产生的原因,为其代谢途径相关调控机制的深入研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

'玉凤'为课题组所在实验室引进的黄花杂交兰品种,'双艺金龙'(SYJL)是'玉凤'(YF)组培过程中选育的突变体株系,其萼片和花瓣边缘出现爪艺(图 1)[17]。2021 年 2 月于福建省农业科学院花卉苗圃采集'玉凤'和'双艺金龙'盛花期花朵,液氮速冻后置于−80 ℃保存,用于后续转录组学和代谢组学分析。每个样品 3 个生物学重复。

1.2 方 法

1.2.1 代谢物提取 参照李秋琳等[18]的方法提取代谢物。将冷冻干燥后的样品研磨成粉末,取 100 mg 样品溶解于 1.2 mL 提取液(甲醇∶水=7∶3)中,每隔 30 min 涡旋 30 s,共 6 次,4 ℃冰箱过夜后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤样品,并保存于进样瓶中,用于超高

效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析。

1.2.2　代谢组分析　利用 UPLC-MS/MS 分析样品提取物。液相条件：色谱柱为 SB-C18(1.8 μm×2.1 mm×100 mm)，流动相 A 为 0.1%甲酸纯水溶液，流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈溶液；洗脱梯度以 95% A 相和 5% B 相为起始，9.00 min 内 B 相比例线性增加至 95%，维持 1 min，10.00～11.10 min B 相比例降至 5%，平衡至 14 min；流速为 0.35 mL/min，柱温为 40 ℃，进样量为 4 μL。质谱条件：使用三重四极杆线性离子阱质谱仪，通过三重四级杆质谱的多反应监测模式(multiple reaction monitoring，MRM)进行质谱数据采集。离子流参数：离子源为涡轮喷雾，源温度 550 ℃，离子喷雾电压+5 500 V/−4 500 V，离子源气体Ⅰ(GSⅠ)、气体Ⅱ(GSⅡ)和帘气(CUR)压力分别设置为 50、60 和 25.0 psi[19]。

利用 R 软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。基于变量重要性投影(variable importance in projection，VIP)≥1，结合差异倍数(fold change，FC)≥2 和 FC≤0.5(3 个生物学重复)的标准，筛选‘玉凤’和‘双艺金龙’间的差异代谢物；同时，对筛选到的差异显著代谢物进行 *KEGG*(kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析[20-21]。

1.2.3　转录组测序　使用植物 RNA 提取试剂盒(TaKaRa，Cat＃9769)提取样品盛花期的总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳、NanoPhotometer 分光光度计、Qubit® 2.0 荧光计和 Agilentbioanalyzer 2100 系统，分别检测 RNA 降解、污染、RNA 纯度、浓度和完整性；使用 NEB-Next® Ultra™ RNA 文库制备试剂盒构建了 6 个样品(3 个生物学重复)的测序文库，并利用 Illumina 高通量测序平台完成测序。该工作由北京诺禾致源生物公司完成。

玉凤 YF　　双艺金龙 SYJL

箭头指示爪艺部位

图 1　表型性状

The arrows indicate the color mutation regions

Fig. 1　Phenotypic traits

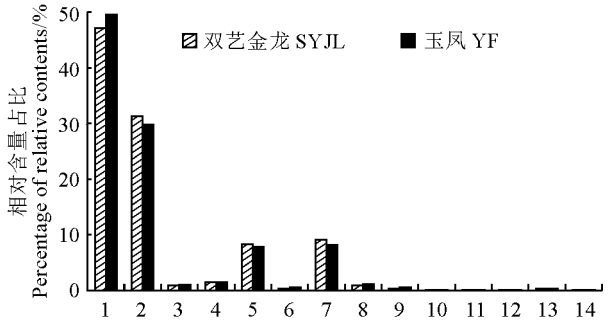
1.2.4　差异表达基因筛选　采用 Trinity 软件[22]对转录组过滤数据(clean reads)进行拼接获得 Unigene。使用 DESeq R 软件[23]确定差异表达基因，并通过多重假设检验校正。Read count 数值为基因差异表达的分析数据，$padj<0.05$ 设置为基因显著差异表达的筛选阈值。使用 KOBAS 软件[24]对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析。

1.2.5　qRT-PCR 验证　将类黄酮生物合成途径中筛选到的差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证。提取样品总 RNA，按照 PrimeScript^{RT} reagent kit with gDNA Eeaser 试剂盒进行反转录合成 cDNA。以 *Actin* 基因为内参基因，参照 TB Green™ Premix Ex Taq™试剂盒说明书，以 cDNA 为模板，在 ABI7500 PCR 仪上完成 qRT-PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每个基因在样品中的相对表达量。

2　结果与分析

2.1　代谢组学分析类黄酮代谢物

杂交兰‘玉凤’和‘双艺金龙’花瓣中共检测到 271 种类黄酮代谢物，其中黄酮醇类和黄酮类代谢物的相对含量占总类黄酮的 30%～50%(图 2)。通过 $VIP\geqslant1$ 且 $FC\geqslant2$ 或 $FC\leqslant0.5$ 筛选显著差异的代谢物。火山图(图 3)显示，‘玉凤’与‘双艺金龙’之间共检测到 38 个显著差异的代谢物(15 个上调，23 个下调)，包括 11 个黄酮醇类，9 个黄酮类，4 个查



1. 黄酮醇；2. 黄酮；3. 二氢黄酮；4. 黄烷醇类；5. 黄酮碳糖苷；6. 查尔酮；7. 二氢黄酮醇；8. 异黄酮；9. 花青素；10. 二氢异黄酮；11. 橙黄酮；12. 原花青素；13. 鞣质；14. 其他类黄酮

图 2　‘玉凤’与‘双艺金龙’中类黄酮化合物相对含量

1. Flavonols; 2. Flavone; 3. Dihydroflavone; 4. Flavanols; 5. Flavonoid carbonoside; 6. Chalcones; 7. Dihydroflavonol; 8. Isoflavones; 9. Anthocyanins; 10. Dihydroisoflavone; 11. Sinensetin; 12. Proanthocyanidins; 13. Tannin; 14. Other flavonoids

Fig. 2　Relative contents of flavonoids in ‘Yufeng’ and ‘Shuangyijinlong’

表 1 '玉凤'与'双艺金龙'中差异显著的代谢物

Table 1 Differentially metabolites between 'Yufeng' and 'Shuangyijinlong'

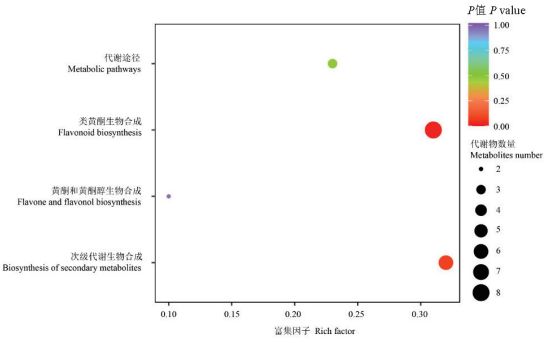
编号 Index	代谢物名称 Compound	物质二级分类 Class Ⅱ	*VIP*	$\log_2 FC$ (YF/SYJL)	差异类型 Type
Lmmn004625	二氢山奈酚-7-O-葡萄糖苷 Dihydrokaempferol-7-O-glucoside	黄酮醇 Flavonols	1.36	13.60	上调 Up
mws0041	黄芩素 Baicalein	黄酮 Flavonoid	1.36	11.10	
Lmtp003079	芍药花素-3-O-芸香糖苷 Peonidin-3-O-rutinoside	花青素 Anthocyanins	1.35	1.68	
mws2118	根皮苷 Phlorizin	查尔酮 Chalcones	1.25	1.59	
Lmfn004093	根皮素-4′-O-葡萄糖苷 Phloretin-4′-O-glucoside	查尔酮 Chalcones	1.24	1.51	
pme0321	山奈酚-7-O-鼠李糖苷 Kaempferol-7-O-rhamnoside	黄酮醇 Flavonols	1.34	1.46	
mws0744	二氢杨梅素 Dihydromyricetin	二氢黄酮醇 Dihydroflavonol	1.31	1.43	
pme1399	黄腐醇 Xanthohumol	查尔酮 Chalcones	1.31	1.22	
mws0042	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	黄烷醇 Flavanols	1.10	1.16	
mws1094	二氢山奈酚 Dihydrokaempferol	二氢黄酮醇 Dihydroflavonol	1.28	1.15	
HJN074	原花青素 A6 Procyanidin A6	原花青素 Proanthocyanidins	1.30	1.15	
mws1290	山奈酚-3-O-(6″-对香豆酰)葡萄糖苷 Kaempferol-3-O-(6″-p-Coumaroyl) glucoside	黄酮醇 Flavonols	1.24	1.10	
Hmqn003268	5,7,3′,4′,5′-五羟基-二氢黄酮 5,7,3′,4′,5′-Pentahydroxydihydroflavone	二氢黄酮 Dihydroflavone	1.22	1.09	
Hmcp002316	异鼠李素-3-O-阿拉伯糖苷 Isorhamnetin-3-O-arabinoside	黄酮醇 Flavonols	1.34	1.01	
Lmhp002800	2′-羟基-5-甲氧基染料木素-4′,7-O-二葡萄糖 2′-Hydoxy,5-methoxyGenistein-4′,7-O-diglucoside	异黄酮 Isoflavones	1.28	1.01	
pmp000365	3,5,7,3′,4′-五羟基-5′-异戊二烯基黄酮 Uralenol	黄酮醇 Flavonols	1.23	−14.38	下调 Down
pmp000638	异戊烯基山奈酚 8-Prenylkaempferol	黄酮 Flavonoid	1.08	−9.77	
pmb2999	金圣草黄素-5-O-葡萄糖苷 Chrysoeriol-5-O-glucoside	黄酮 Flavonoid	1.32	−4.14	
mws0988	鼠李素 Rhamnetin	黄酮醇 Flavonols	1.33	−3.35	
Zmhn001257	儿茶素-5-O-葡萄糖苷 Catechin-5-O-glucoside	黄烷醇 Flavanols	1.05	−2.92	
pmb3014	木犀草素-7-O-[6″-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰)]葡萄糖苷 Luteolin-7-O-(6″-eudesmyl) glucoside	黄酮 Flavonoid	1.25	−2.07	
pmb2979	橙皮素-7-O-(6″-丙二酰)葡萄糖苷 Hesperetin-7-O-(6″-malonyl) glucoside	二氢黄酮醇 Dihydroflavonol	1.34	−1.94	
mws0913	三叶豆苷 Trifolin	黄酮醇 Flavonols	1.31	−1.77	
ws0089	山奈酚-7-O-葡萄糖苷 Kaempferol-7-O-glucoside	黄酮醇 Flavonols	1.34	−1.68	
pmb2996	毡毛美洲茶素-7-O-葡萄糖醛酸苷 Velutin-7-O-glucuronide	黄酮 Flavonoid	1.22	−1.67	
Lmgp004731	染料木素-7-O-半乳糖苷 Genistein-7-O-galactoside	异黄酮 Isoflavones	1.30	−1.61	
ws1326	草质素 Herbacetin	黄酮醇 Flavonols	1.32	−1.53	
pmp000588	香叶木素-7-O-(6″-O-丙二酰)葡萄糖苷 Diosmetin-7-O-(6″-malonyl) glucoside	黄酮 Flavonoid	1.26	−1.43	
mws0046	柚皮苷 Naringin	二氢黄酮 Dihydroflavone	1.36	−1.30	
pmn001642	山奈酚-3-O-(2″-O-乙酰)葡萄糖醛酸苷 Kaempferol-3-O-(2″-O-acetyl) glucuronide	黄酮醇 Flavonols	1.17	−1.26	
mws0044	二氢槲皮素 Dihydroquercetin	二氢黄酮醇 Dihydroflavonol	1.25	−1.18	
pmb0738	苜蓿素-7-O-(2″-芥子酰)葡萄糖苷 Tricin-7-O-(2″-Sinapoyl) glucoside	黄酮 Flavonoid	1.25	1.17	
mws1066	柚皮素-7-O-芸香糖苷 Naringenin-7-O-rutinoside	二氢黄酮 Dihydroflavone	1.36	−1.10	
HJAP011	金圣草黄素-8-C-葡萄糖苷 Chrysoeriol-8-C-glucoside	黄酮 Flavonoid	1.34	−1.08	
pme2954	槲皮素 Quercetin	黄酮醇 Flavonols	1.23	−1.08	
pmp000120	香叶木素-6-C-葡萄糖苷 Diosmetin-6-C-glucoside	黄酮 Flavonoid	1.19	−1.06	
Lmsp008443	3,3′,5-三羟基-4′,7-二甲氧基黄烷酮 3,3′,5-Trihydroxy-4′,7-dimethoxyflavanone	二氢黄酮 Dihydroflavone	1.23	−1.05	
Hmpn005101	羟基根皮苷 Sieboldin	查尔酮 Chalcones	1.30	−1.05	

尔酮类，4 个二氢黄酮醇类，4 个二氢黄酮类，2 个黄烷醇类，2 个异黄酮类，1 个花青素类和 1 个原花青素类（表 1）。‘玉凤’中差异倍数最高的代谢物是二氢山奈酚-7-O-葡萄糖苷（黄酮醇类），其含量是‘双艺金龙’的 124 444 倍；‘双艺金龙’中差异倍数最高的代谢物是 3，5，7，3′，4′-五羟基-5′-异戊二烯基黄酮（黄酮醇类），其含量是‘玉凤’的 7 244 倍。

进一步利用 KEGG 数据库对显著差异代谢物进行通路富集分析。如图 4 所示，共富集到 4 条代谢通路，分别是类黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、次级代谢生物合成和代谢途径，其中富集程度最显著的是类黄酮生物合成途径（ko00941，$P<0.05$）。该途径中筛选到的差异代谢物有 8 种，其中根皮苷、黄腐醇、二氢山奈酚、二氢杨梅素和表没食子儿茶素等 5 种代谢物上调表达，柚皮苷、二氢槲皮素和槲皮素等 3 种代谢物下调表达。推测这些代谢物含量上的变化可能造成了‘玉凤’与‘双艺金龙’花色上的差异。

2.2　转录组学鉴定差异表达基因

为分析类黄酮生物合成途径相关基因及其表达水平，利用 Illumina 测序平台对‘玉凤’和‘双艺金龙’盛花期花朵 cDNA 文库进行转录组测序。共获得 292 497 320 个过滤序列，产生 44.6 Gb 数据，Q20



纵坐标为代谢通路名称；横坐标为每个通路对应的富集程度；点的颜色为 P 值，越红表示富集越显著；点的大小代表富集到的差异代谢物的数量；图 6 同

图 4　差异代谢物 KEGG 通路富集分析

The ordinate represents the enriched metabolism pathways; The abscissa represents the enrichment degree of each pathway; The color and size of point represent P value and differential metabolites number, respectively; The redder the more significant enrichment these points, the bigger the more metabolites number; The same as Fig. 6

Fig. 4　Enriched KEGG pathways of differentially metabolites

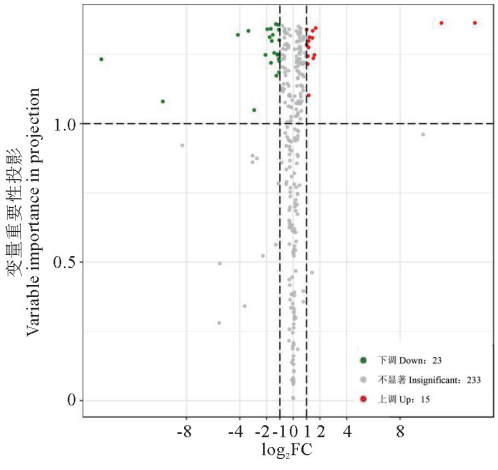


图 3　‘玉凤’与‘双艺金龙’的差异代谢物火山图

Fig. 3　Volcano plot of differentially metabolites between ‘Yufeng’ and ‘Shuangyijinlong’

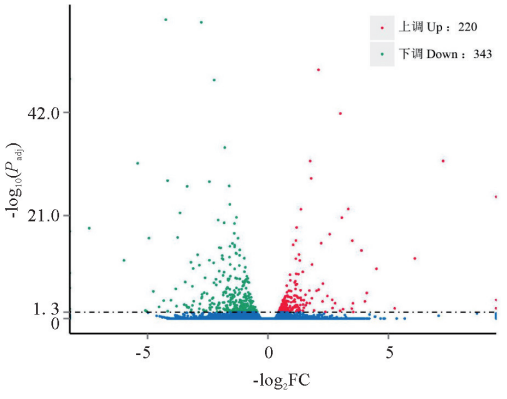


图 5　‘玉凤’和‘双艺金龙’中的差异表达基因火山图

Fig. 5　Volcano plot of differentially expressed genes in ‘Yufeng’ and ‘Shuangyijinlong’

表 2　‘玉凤’和‘双艺金龙’的转录组数据产出质量

Table 2　Data quality of RNA-seq in ‘Yufeng’ and ‘Shuangyijinlong’

样本 Sample	原始序列 Raw read	过滤序列 Clean read	过滤碱基 Clean base/G	错误率 Error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC/%	匹配序列（效率/%） Mapped read (Efficiency)
YF-1	47 990 018	47 562 748	7.50	0.04	97.65	93.12	46.25	26 541 984 (57.95)
YF-2	48 226 254	47 625 936	7.50	0.04	97.72	93.27	46.18	26 963 212 (56.61)
YF-3	49 715 666	49 212 742	7.38	0.04	97.86	93.58	46.12	28 190 784 (57.28)
SYJL-1	46 677 362	46 198 636	6.92	0.04	97.82	93.50	46.27	25 477 998 (55.15)
SYJL-2	51 309 490	50 740 444	7.62	0.04	97.67	92.92	46.69	27 698 356 (54.59)
SYJL-3	51 935 166	51 156 814	7.68	0.04	97.59	93.36	46.29	28 421 550 (55.56)
总计 Total	295 853 956	292 497 320	44.60					163 293 884 (55.83)

和 Q30 分别大于 96%和 93%，GC 含量高于 46%，且 2 个品种中匹配到参考序列上的片段在过滤序列中所占比例为 55.83%(表 2)，说明测序质量高，可用于后续基因表达分析。

转录组测序共筛选到 563 个差异表达基因($padj<0.05$)，与'玉凤'相比，'双艺金龙'中有 220(39.1%)个基因上调表达，343(60.9%)个基因下调表达(图 5)。KEGG 富集分析结果显示，199 个差异表达基因被注释到了 125 条代谢途径，显著富集的 20 条代谢通路，涉及到雌激素信号通路、抗原处理和呈递、内质网蛋白加工过程、植物-病原菌相互作用、MAPK 信号途径和类黄酮生物合成途径等(图 6)。类黄酮生物合成途径在植物花瓣呈色中起关键作用，因此推测类黄酮生物合成途径中的基因可能是杂交兰花色变化的关键基因。该通路富集到 7 个差异表达基因，分别是咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(caffeoyl-CoA O-methyltransferase，CCoAOMT)基因、查尔酮合酶(chalcone synthase，CHS)基因、查尔酮异构酶(chalcone isomerase，CHI)基因、黄酮醇合酶(flavonol synthase，FLS)基因和黄烷酮 3-双加氧酶(dihydroflflavonol-3-hydrogenase，F3H)基因，其中 *CHI*、*F3H* 和 *FLS* 基因在'双艺金龙'中的表达量下调，3 个 *CHS* 基因表达量既有上调也有下调，

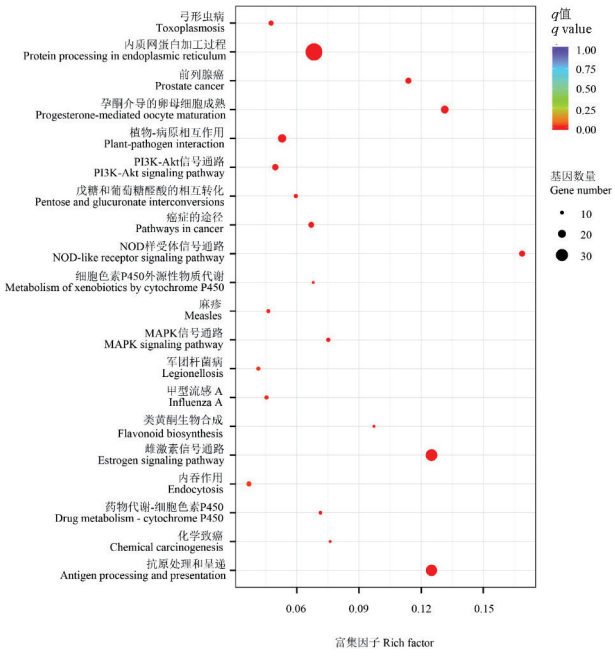
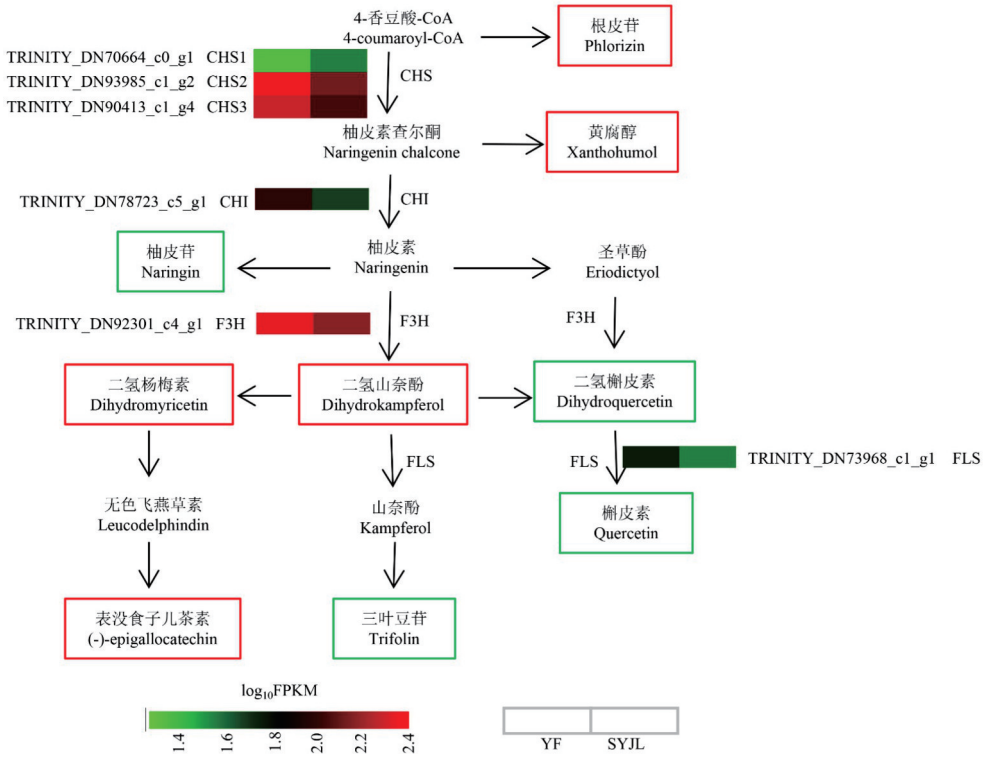


图 6 差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 6 Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes



红色和绿色方框分别代表'玉凤'中的上调代谢物和下调代谢物

图 7 杂交兰类黄酮生物合成通路代谢物积累及其相关基因表达的联合分析

Red and green boxes indicate up-regulated and down-regulated metabolites in 'Yufeng', respectively

Fig. 7 Joint analysis of metabolite accumulation and related genes expression in flavonoid biosynthesis pathways of *Cymbidium* hybrid

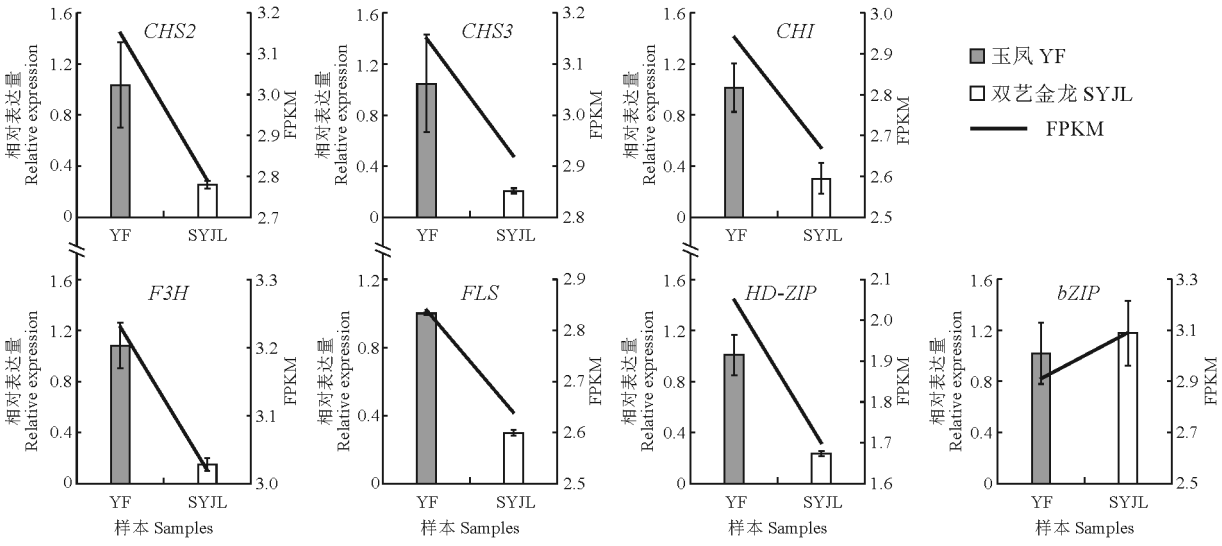


图 8　7 个差异表达基因的 qRT-PCR 检测

Fig. 8　Expression analysis of seven structural genes in the flavonoid biosynthesis pathway by qRT-PCR

CCoAOMT 基因表达量上调。

2.3　转录组与代谢组联合分析

差异表达基因和差异代谢物共同注释到类黄酮生物合成途径，绘制了与花色变异相关的关键基因和代谢物之间的网络图（图 7）。鉴定了参与类黄酮生物合成的 6 个差异表达基因和 8 个差异代谢物。‘玉凤’中结构基因 *CHS*、*CHI* 和 *F3H* 的表达量上调，使查尔酮类化合物根皮苷、黄腐醇和黄酮醇类化合物二氢山奈酚、二氢杨梅素含量在‘玉凤’中正常积累，*FLS* 在‘玉凤’中的高表达促进表没食子儿茶素的合成，形成纯黄色花瓣。相反，‘双艺金龙’中结构基因 *CHS*、*CHI* 和 *F3H* 的表达量下降，导致二氢山奈酚、二氢杨梅素合成受阻，使部分代谢流向上游的支路进行分流，通向柚皮素的代谢流被转移到旁侧支路合成柚皮苷，通向圣草酚的代谢流则依次催化合成二氢槲皮素和槲皮素。以上分析表明，类黄酮代谢途径上游基因 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS* 的低表达可能导致了‘玉凤’与‘双艺金龙’花色差异的产生。

2.4　qRT-PCR 验证

为验证转录组结果的准确性，利用 qRT-PCR 检测了类黄酮结构基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*FLS* 和转录因子基因的表达水平。结果显示，7 个基因在 qRT-PCR 与转录组数据中具有相似的表达趋势（图 8）。其中，在杂交兰花艺突变体‘双艺金龙’花瓣中，与类黄酮生物合成相关的基因 *CHS2*、*CHS3*、*CHI*、*F3H*、*FLS* 表达量及转录因子基因 *HD-ZIP* 均显著下降，而转录因子基因 bZIP 表达量在杂交兰及其突变体中无显著差异。

3　讨　论

花艺是中国兰鉴赏中的重要质量指标，也是影响优质中国兰品种评价标准和消费者接受度的关键参数[25]。组织培养是中国兰生产中重要的育苗手段[26]。在中国兰组织培养过程中的变异常常会引起花色变异，而花色的改变主要取决于色素种类（类胡萝卜素、类黄酮、叶绿素）、组成和含量[4,27]。植物中的类黄酮分为 6 大类：黄酮醇类、黄酮类、花青素类、查尔酮类、黄烷酮类和异黄酮类，它们含量上的差异会影响花瓣的呈色[28-30]。通常查尔酮、黄酮醇与黄色花瓣的形成有关，如香石竹的黄色色素是查尔酮[31]，莲花[32]和荷花[33]的黄色色素是黄酮醇。前期研究发现类黄酮化合物是杂交兰黄色花瓣的主要色素[16,34]，因此，本研究着重于类黄酮代谢物的检测，通过靶向代谢组分析鉴定了黄酮醇类、黄酮类、花青素类和查尔酮类等 271 种代谢物（含 38 个差异代谢物），其中黄酮醇类代谢物的相对含量在 2 个品种中均是最高的，占总类黄酮代谢物相对含量的 47.10%～49.55%，说明黄酮醇类化合物是‘玉凤’及其突变体的主要色素成分。但黄酮醇尤其是二氢山奈酚-O-葡萄糖苷、山奈酚-7-O-鼠李糖苷、山奈酚-3-O-(6″-对香豆酰)葡萄糖苷及其上游底物二氢山奈酚，在‘玉凤’中的相对含量明显高于‘双艺金龙’突变体中的含量，表明同一黄酮醇成分在 2 个品种中的含量上存在明显差异。差异代谢物分析中还发现，查尔酮类化合物根皮素、根皮素-4′-O-葡萄糖

苷和黄腐醇的含量也呈下降趋势，推测上述物质含量上的变化对突变体‘双艺金龙’花瓣边缘艺的形成具有重要作用。此外，Xing 等[30]指出山奈酚乙酰葡萄糖苷、山奈酚 3-O-半乳糖苷（三叶豆苷）和山奈酚-O-戊糖苷-O-己糖苷在棉花白色花瓣中具有重要的作用。通过对‘玉凤’和‘双艺金龙’突变体中山奈酚衍生物的比较分析，发现山奈酚-3-O-半乳糖苷和山奈酚-3-O-（2″-O-乙酰）葡萄糖醛酸苷在‘双艺金龙’突变体中的相对含量明显高于‘玉凤’，这可能也是突变体‘双艺金龙’花瓣边缘形成艺的因素之一。

黄酮类化合物的合成往往受其代谢途径中多个结构基因的共同调控[35-36]。在类黄酮生物合成途径中，CHS 是第一个关键的限速酶，其基因表达变化可影响植物花色深浅[37]。CHI 是继 CHS 之后的一个催化酶，可将上游黄色的底物查尔酮转变成无色的黄烷酮柚皮素，然后经 F3H 催化形成 3 种无色的二氢黄酮醇[35]。在矮牵牛中，*CHS-A* 基因表达被抑制，使得其花朵上出现了白色斑块[38]；*F3H* 基因的表达被抑制后，其花朵颜色变成了白色[39]。Itoh 等[31]也报道，香石竹中 *CHI* 基因被转座子破坏后其黄色花中形成白色斑点。本研究转录组和定量表达结果分析中，*CHS*、*CHI* 和 *F3H* 基因在‘双艺金龙’突变体中均表达下调，推测它们可能是使‘双艺金龙’突变体花瓣边缘形成白色半透明斑纹的重要基因。FLS 是黄酮醇合成分支上的关键酶，其与下游催化酶二氢黄酮醇还原酶（dihydroflavonol-4-reductase，DFR）之间的竞争关系可决定上游底物的代谢流方向[40]。在本研究中，两个品种中 *DFR* 基因表达量波动不大，而 *FLS* 基因在‘玉凤’中的表达上调，说明二氢黄酮醇的转化更偏向黄酮醇，不合成或少量合成花青素，同时，在‘双艺金龙’中流向黄酮醇的部分支路受限，与黄酮醇化合物相对含量变化相一致。因此，‘双艺金龙’突变体花艺的产生可能与类黄酮生物合成途径的早期结构基因 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS* 的低表达有关。

综上所述，本研究通过代谢组、转录组对杂交兰花瓣中类黄酮代谢物进行了比较分析，共鉴定 38 种差异表达代谢物和 563 个差异表达基因，这些差异表达代谢物和差异表达基因参与的与花色相关的代谢途径主要涉及类黄酮生物合成途径及黄酮和黄酮醇生物合成途径。在类黄酮生物合成途径中，早期结构基因 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS* 在‘双艺金龙’突变体中的下调表达可能引起了黄酮类代谢物含量上的变化，进而导致其花瓣边缘艺的形成。

参考文献：

[1] 曹 桦，李 涵，苗 振，等. 铁皮石斛叶色突变体初步研究[J]. 核农学报，2017，**31**(3)：461-471.
CAO H，LI H，MIAO Z，*et al*. The preliminary study of leaf-color mutant in *Dendrobium officinale*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*，2017，**31**(3)：461-471.

[2] 陈 璋. 叶(线)艺兰的人工诱发与培育[J]. 花木盆景，2001，(6)：14-15.
CHEN Z. Artificial induction and cultivation of ye(xian) Yilan[J]. *Flowers Trees Potted Landscape*，2001，(6)：14-15.

[3] 史宗义. 叶艺兰鉴赏与栽培[J]. 中国花卉园艺，2021，(5)：60-62.
SHI Z Y. Appreciation and cultivation of ye Yilan[J]. *China Flowers & Horticulture*，2021，(5)：60-62.

[4] 赵 虎，邢 海，孙叶芳，等. 国兰叶艺及其在花上的表现关系[J]. 现代农业科技，2016，(7)：152-153.
ZHAO H，XING H，SUN Y F，*et al*. Orchid leaf art and its relationship with flowers[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*，2016，(7)：152-153.

[5] 王彩霞，田韦韦，田 敏，等. 文心兰黄化突变体的初步研究[J]. 核农学报，2013，**27**(12)：1 845-1 852.
WANG C X，TIAN W W，TIAN M，*et al*. The preliminary study of xantha mutants in *Oncidium*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*，2013，**27**(12)：1 845-1 852.

[6] TSAI C C，WU Y J，SHEUE C R，*et al*. Molecular basis underlying leaf variegation of a moth orchid mutant (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)[J]. *Frontiers in Plant Science*，2017，**8**：1 333.

[7] 熊剑锐，何俊蓉，蒋 彧，等. 中国兰春剑隆昌素叶色突变体光合特性的初步研究[J]. 辽宁农业科学，2015，(2)：23-27.
XIONG J R，HE J R，JIANG Y，*et al*. Analysis of leaf photosynthetic characteristics on leaf color mutants in Chinese orchid *Cymbidium* ‘longchangsu’[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*，2015，(2)：23-27.

[8] GAO J，LIANG D，XU Q Q，*et al*. Involvement of *CsERF2* in leaf variegation of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’[J]. *Planta*，2020，**252**(2)：29.

[9] ZHU G F，YANG F X，SHI S S，*et al*. Transcriptome characterization of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’ using 454 pyrosequencing and its application in the identification of genes associated with leaf color variation[J]. *PLoS One*，2015，**10**(6)：e0128592.

[10] 艾　叶，陈　娟，郑清冬，等. 建兰水晶艺叶片的超微结构和转录组学分析[J]. 西北植物学报，2020，**40**(3)：382-393.
AI Y，CHEN J，ZHENG Q D，*et al*. Ultrastructure and transcriptomic analysis of crystal leaf mutant of *Cymbidium ensifolium*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*，2020，**40**(3)：382-393.

[11] AI Y，LI Z，SUN W H，*et al*. The *Cymbidium* genome reveals the evolution of unique morphological traits[J]. *Horticulture Research*，2021，**8**(1)：255.

[12] 林榕燕，吴建设，林　兵. 杂交兰尿卟啉原脱羧酶基因的克隆及其表达分析[J]. 核农学报，2020，**34**(9)：1 898-1 905.
LIN R Y，WU J S，LIN B，*et al*. Cloning and expression analysis of uroporphyrinogen decarboxylase gene from *Cymbidium* hybrid[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*，2020，**34**(9)：1 898-1 905.

[13] 钟淮钦，林榕燕，吴建设，等. 杂交兰‘紫妍氏’叶艺性状的生理生化与细胞结构分析[J]. 西北植物学报，2021，**41**(7)：1 165-1 174.
ZHONG H Q，LIN R Y，WU J S，*et al*. Physiological，biochemical and cell structure analysis of leaf mutant traits in *Cymbidium* hybrid ‘purple element’[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*，2021，**41**(7)：1 165-1 174.

[14] 卢珍红，莫锡君，蒋亚莲，等. 菊花黄化突变体初步研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学)，2017，**37**(2)：60-68.
LU Z H，MO X J，JIANG Y L，*et al*. The preliminary study of chlorina mutant in *Dendranthema morifolium*[J]. *Journal of Southwest Forestry University*（Natural Sciences)，2017，**37**(2)：60-68.

[15] ZHAO M H，LI X，ZHANG X X，*et al*. Mutation mechanism of leaf color in plants：A review[J]. *Forests*，2020，**11**(8)：851.

[16] 孔　兰，樊荣辉，林榕燕，等. 杂交兰花色花香生物合成途径的转录组分析[J]. 西北植物学报，2021，**41**(1)：86-95.
KONG L，FAN R H，LIN R Y，*et al*. Transcriptome analysis of pigment biosynthesis and floral scent biosynthesis in *Cymbidium* hybrid[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*，2021，**41**(1)：86-95.

[17] 陈南川，陈少云，陈南东，等. 杂交兰新品种‘双艺金龙’[J]. 园艺学报，2020，**47**(S2)：3 054-3 055.
CHEN N C，CHEN S Y，CHEN N D，*et al*. A new hybrid *Cymbidium* cultivar ‘Shuangyi jinlong’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*，2020，**47**(S2)：3 054-3 055.

[18] 李秋琳，李　燕，陈　伟，等. 基于广泛靶向代谢组学的不同颜色棉花花瓣中类黄酮成分差异分析[J]. 棉花学报，2021，**33**(6)：482-492.
LI Q L，LI Y，CHEN W，*et al*. Metabolomics reveals the variation of flavonoids content in petals of cotton with different colors[J]. *Cotton Science*，2021，**33**(6)：482-492.

[19] CHEN W，GONG L，GUO Z L，*et al*. A novel integrated method for large-scale detection，identification，and quantification of widely targeted metabolites：Application in the study of rice metabolomics[J]. *Molecular Plant*，2013，**6**(6)：1 769-1 780.

[20] OGATA H，GOTO S，SATO K，*et al*. KEGG：Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*，1999，**27**(1)：29-34.

[21] ZHAO Y，ZHOU W J，CHEN Y，*et al*. Metabolite analysis in *Nymphaea* ‘Blue Bird’ petals reveal the roles of flavonoids in color formation，stress amelioration，and bee orientation[J]. *Plant Science*，2021，**312**：111 025.

[22] GRABHERR M G，HAAS B J，YASSOUR M，*et al*. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*，2011，**29**(7)：644-652.

[23] WANG L K，FENG Z X，WANG X，*et al*. DEG seq：An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*，2010，**26**(1)：136-138.

[24] MAO X Z，CAI T，OLYARCHUK J G，*et al*. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology（KO）as a controlled vocabulary[J]. *Bioinformatics*，2005，**21**(19)：3 787-3 793.

[25] 蒋细旺. 中国兰花优质品种评价研究[J]. 江汉大学学报，2000，**17**(6)：16-18.
JIANG X W. Appraisal studies on high quality cultivar of Chinese orchid[J]. *Journal of Jianghan University*，2000，**17**(6)：16-18.

[26] 王　玲. 国兰育种技术研究进展[J]. 生物灾害科学，2022，**45**(1)：8-13.
WANG L. Research advances of Chinese orchid breeding technology[J]. *Biological Disaster Science*，2022，**45**(1)：8-13.

[27] 李文建，冯　景，贾文庆，等. 建兰花色形成的分子调控机理研究[J]. 西北植物学报，2018，**38**(4)：615-623.
LI W J，FENG J，JIA W Q，*et al*. Molecular regulation mechansim of floral color formation in *Cymbidium ensifolium*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*，2018，**38**(4)：615-623.

[28] GROTEWOLD E. The genetics and biochemistry of floral pigments[J]. *Annual Review of Plant Biology*，2006，**57**：761-780.

[29] ZHANG A A，ZHENG J，CHEN X M，*et al*. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome reveals the flavonoid metabolic pathway is associated with fruit peel coloration of melon[J]. *Molecules*（Basel，Switzerland)，2021，**26**(9)：2 830.

[30] XING A S，WANG X Y，NAZIR M F，*et al*. Transcriptomic and metabolomic profiling of flavonoid biosynthesis provides novel insights into petals coloration in Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.)[J]. *BMC Plant Biology*，2022，**22**(1)：416.

[31] ITOH Y，HIGETA D，SUZUKI A，*et al*. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*)[J].

Plant & Cell Physiology, 2002, **43**(5): 578-585.

[32] ZHU H H, YANG J X, XIAO C H, *et al*. Differences in flavonoid pathway metabolites and transcripts affect yellow petal colouration in the aquatic plant *Nelumbo nucifera*[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 277.

[33] 刘青青, 张大生, 刘凤栾, 等. 荷花花色研究进展[J]. 园艺学报, 2021, **48**(10): 2 100-2 112.
LIU Q Q, ZHANG D S, LIU F L, *et al*. Advances in flower color research on lotus (*Nelumbo*)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, **48**(10): 2 100-2 112.

[34] 孔 兰, 林榕燕, 樊荣辉, 等. 杂交兰花瓣类黄酮成分分析及其对花色的影响[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(10): 1 711-1 719.
KONG L, LIN R Y, FAN R H, *et al*. Flavonoids component analysis in *Cymbidium* hybrid petals and its effects on flower coloration[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(10): 1 711-1 719.

[35] ZHAO D Q, TAO J. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 261.

[36] LI L, YE J, LI H H, *et al*. Characterization of metabolites and transcripts involved in flower pigmentation in *Primula vulgaris*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 572 517.

[37] 胡梦蝶, 李佳伟, 崔顺立, 等. 花生花斑种皮花青素合成的转录组-代谢组联合分析[J]. 植物遗传资源学报, 2021, **22**(6): 1 732-1 745.
HU M D, LI J W, CUI S L, *et al*. Transcriptomic-metabolomics joint analysis of anthocyanin synthesis for variegated testa in peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, **22**(6): 1 732-1 745.

[38] KOSEKI M, GOTO K, MASUTA C, *et al*. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'Red Star' flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2005, **46**(11): 1 879-1 883.

[39] SCHIJLEN E G W M, RIC DE VOS C H, VAN TUNEN A J, *et al*. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants[J]. *Phytochemistry*, 2004, **65**(19): 2 631-2 648.

[40] 邢梦云. 杨梅 FLSs 和 F3′5′H 调控杨梅素生物合成的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

(编辑:宋亚珍)

Introduction of the Plant Front Cover: *Rheum nobile*

Rheum nobile J. D. Hooker et Thomson, also named Gaoshan Da Huang, belongs to a member of the genus *Rheum* from the family Polygonaceae.

The plants are perennial herbs, having stout roots and rhizomes which can be used as medicine. The stems are simple, erect, 1—2 m tall, with numerous basal leaves, stem leaves and leaf-like bractes. The basal leaves are rosulate, orbicular, ovate, or cordate-ovate, 20—30 cm in diam. The stem leaves and leaf-like bracts are smaller upward, suborbicular, 5—13 cm in diam. The bracts are yellowish, covered with each other to form an airtight and translucent tower shaped greenhouse to resist high altitude, low temperature, strong wind and strong ultraviolet rays, and protect the axillary inflorescences inside the bracts.

Rheum nobile needs as much as 15—45 years of vegetative growth to accumulates enough nutrients until it matures. It blossoms once a lifetime, then the plant dies as the fruit matures with the final nutrients distributed to the seeds. Flowering from June to July; fruiting in September.

Rheum nobile is an endemic Himalayan species, growing on alpine scree slopes and meadows at elevations of 4 000—4 800 m above sea level. It belongs to a group that has evolved and specialized with the rise of the Qinghai-Tibet Plateau and to adapt to the special environment of high mountains. Because of its extremely harsh growth environment, and long vegetative growth and phenological period, *R. nobile* is awfully rare.

(LUO Jian)