

桂花新品种‘胭脂红’不同发育阶段花瓣非靶向代谢组学分析

柴子涵^{1,2}, 张 敏^{1,2}, 李 岚^{1,2}, 张 成^{1,2}, 段一凡^{1,2*}

(1. 南京林业大学 生物与环境学院, 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037;

2. 木犀属植物栽培品种国际登录中心, 江苏 南京 210037)

摘 要:‘胭脂红’(*Osmanthus fragrans* ‘Yanzhi Hong’)是近几年报道过的一个桂花新品种,其花色为特殊的胭脂红色。为探究‘胭脂红’的特殊性和潜在的应用价值,通过非靶向代谢组学的方法,对不同发育阶段(初花期 S1、盛花期 S2 和末花期 S3)‘胭脂红’花瓣中代谢物的种类和积累规律进行研究。结果表明,‘胭脂红’花瓣中共检测到 304 种代谢物。其中 6 种环烯醚萜类和 1 种黄酮类药用化学成分是首次在桂花中检测到;从 S1 到 S3,苦杏仁苷的相对含量逐渐降低,连翘酯苷 E、5-O-甲基维斯阿米醇苷、连翘酯苷和大车前苷的相对含量先下降后上升,桃叶珊瑚苷和金雀异黄酮的相对含量先上升后下降。所测代谢物中有 34 种与花香有关的香气成分,其中含量最高的是紫苏醇,其次是 3,4-二羟基苯丙酸酯、香叶酸和茉莉酮酸甲酯等。KEGG 富集分析显著富集到与花香有关的苯丙氨酸和 α -亚麻酸代谢途径,以及与花色有关的类单萜生物合成途径。综合分析,‘胭脂红’有着特殊的药用化学成分、独特的香气成分组成和花色,作为桂花的新品种,有着重要的药物开发和经济利用价值。

关键词:桂花;新品种;非靶向代谢组学;环烯醚萜;香气成分

中图分类号:Q945.31

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2022)04-0107-07

Non-Targeted Metabolomics Analysis of the Petals of *Osmanthus fragrans* ‘Yanzhi Hong’ in Different Developmental Phases

CHAI Zi-han^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, LI Lan^{1,2}, ZHANG Cheng^{1,2}, DUAN Yi-fan^{1,2*}

(1. College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. International Cultivar Registration Center for Osmanthus, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: *Osmanthus fragrans* ‘Yanzhi Hong’ is a new cultivar reported in recent years, whose petals color is specially carmine. In order to explore the particularity and potential application value of the cultivar ‘Yanzhi Hong’, this study used non-targeted metabolomics methods to analyze the types and accumulation rules of petals metabolites at 3 developmental phases: primary blooming stage (S1), full blooming stage (S2) and late blooming stage (S3). The results showed that a total of 304 metabolites were detected in the petals. Among them, 6 iridoids and 1 flavonoid were firstly detected in *O. fragrans*. From S1 to S3, the relative content of amygdalin gradually decreased; the relative contents of forsythoside E, 5-O-methylvisammioside, forsythoside and plantamajoside decreased first and then increased; the relative contents of aucubin and genistein increased first and then decreased. There were 34 aroma components in the tested metabolites, in which the highest relative content was perillyl alcohol, followed by 3,4-dihydroxyphenylpropanoate, geranic acid and methyl jasmonate. According to the comprehensive analysis, as a new cultivar, *O. fragrans* ‘Yanzhi

收稿日期:2021-06-30 修回日期:2021-09-28

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20200786);中国博士后科学基金(2019M651839)。

第一作者:柴子涵。研究方向:树木学。E-mail:czh31512451@163.com

* 通信作者:段一凡,博士,副教授,硕士生导师。研究方向:树木学。E-mail:yifan419@hotmail.com

Hong', which has special medicinal chemical components, unique composition of aroma components and petals colors, has significant values in drug development and economic utilization.

Key words: *Osmanthus fragrans*; new cultivar; non-targeted metabolomics; iridoid; aroma component

桂花学名木犀 (*Osmanthus fragrans*), 隶属于木犀科 (Oleaceae) 木犀属 (*Osmanthus*), 既是优良的园林绿化树种, 也是著名的香花植物^[1]。桂花是我国传统十大名花之一, 有着 2 500 a 以上的栽培历史^[2]。在长期的栽培过程中, 人们选育出了丰富的桂花品种。前人根据花期、花色、结籽与否、叶色等观赏性状特征, 将桂花分为 5 大品种群: 四季桂品种群 (Asiaticus Group)、银桂品种群 (Albus Group)、金桂品种群 (Luteus Group)、丹桂品种群 (Aurantiacus Group) 以及彩叶桂品种群 (Colour Group)^[3-4]。虽然在长期的驯化过程中, 桂花形成了黄白色—黄色—橙黄色的不同颜色梯度的品种, 但颜色较为单一, 缺少其他色系的品种^[5]。2014 年桂花新品种‘胭脂红’通过木犀属植物栽培品种国际登录中心的实质审查, 该品种初开时呈淡黄色, 后逐渐呈胭脂红色^[6]。因其独特的花色, ‘胭脂红’填补了红色系桂花品种的空白。

代谢组学是研究生物体某阶段各种小分子代谢产物变化的理想技术手段, 主要可以分为靶向代谢组学和非靶向代谢组学^[7]。靶向代谢组学利用前期建立的代谢物数据库, 可以对目标代谢物进行绝对定量分析^[8]。虽然靶向代谢组学有着准确度高、特异性强的特点, 但非靶向代谢组学可以全面分析生物体内代谢物的种类, 无差别筛选代谢物, 最终可以最大限度和最大范围检测生物体中的代谢物变化情况^[9]。因此, 本研究以不同发育阶段的‘胭脂红’花瓣为材料, 利用非靶向代谢组学分析其代谢物种类和含量的时序性变化, 以期探寻该品种所含特殊的代谢物及其合成积累规律, 为挖掘‘胭脂红’的潜在价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

‘胭脂红’采自浙江省金华市华安园林苗木基地 (119°38'42.57"E, 28°58'15.51"N)。根据花瓣的外部特征和颜色变化, 确定了 3 个具有代表性的发育阶段 (图 1)。采集初花期 (S1)、盛花期 (S2) 和末花期 (S3) 花瓣, 液氮速冻后 -80 °C 保存, 每个发育阶段样品重复 3 次。

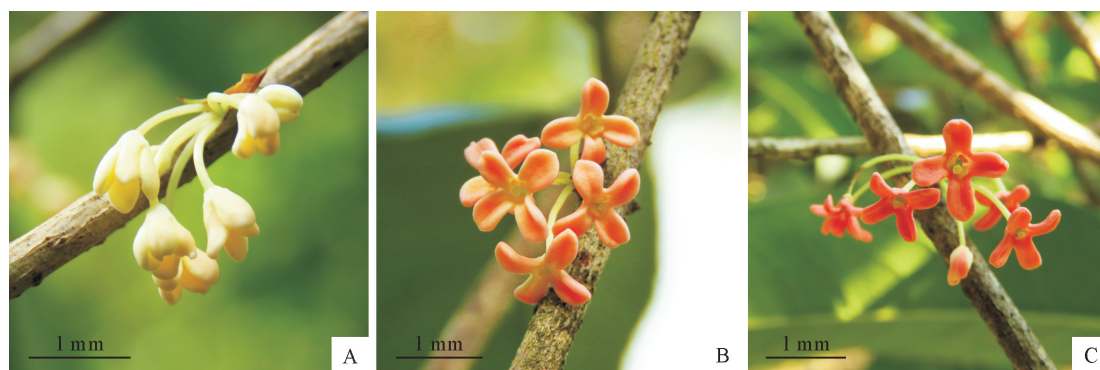
1.2 代谢物提取方法

首先将样品冷冻干燥处理, 利用 SCIENTZ-48 组织研磨仪 (新芝, 中国) 进行研磨 (55 Hz, 60 s); 精确称量 100 mg 研磨后的样本至 2 mL EP 管中, 加入 0.6 mL 含内标的甲醇 (67-56-1, 99.0%, Thermo Fisher), 涡旋振荡 30 s; 冰水浴中超声 15 min, 4 °C 过夜后, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 取上清液, 0.22 μm 膜过滤后进行 LC-MS 上机检测^[10]。

1.3 上机检测及相关参数设置

使用 UltiMate 3 000 液相色谱仪 (Thermo Fisher, 美国) 对样品进行分离。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm (2.1×150 mm) 色谱柱 (Waters, 美国), 柱温设为 40 °C, 自动进样器温度设为 8 °C, 进样体积为 2 μL。正离子流动相 A 为体积分数 0.1% 的甲酸 (64-18-6, LC-MS 级, TCI)—水溶液, 流动相 B 为体积分数 0.1% 的甲酸—乙腈 (75-05-8, 99.9%, Thermo Fisher) 溶液; 负离子流动相 A 为 5 mmol/L 甲酸铵 (540-69-2, 99.9%, Sigma)—水溶液, 流动相 B 为乙腈^[11]。

使用 Q Exactive Plus 质谱仪 (Thermo Fisher, 美国) 进行质谱数据采集。正离子喷雾电压为 3.50



注: A. 初花期 (S1); B. 盛花期 (S2); C. 末花期 (S3)。

图 1 不同发育阶段‘胭脂红’

Fig. 1 Different developmental phases of *Osmanthus fragrans* ‘Yanzhi Hong’

kV,负离子喷雾电压为 2.50 kV。毛细管温度为 325 ℃,以分辨率 70 000 进行全扫描,扫描范围为 81~1 000。采用 HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息^[12]。

1.4 数据预分析

通过 Proteowizard(v3.0.8789)将获得的原始质谱数据转成 mzXML 格式,使用 R(v4.1)的 XCMS 包进行峰识别、峰过滤和峰对齐等处理,主要参数设定为 bw=2、ppm=15、peakwidth=c(5,30)、mzwid=0.015、mzdiff=0.01、method=centWave^[13]。

1.5 代谢物相对定量与鉴定

本研究基于 UPLC/HRMS 进行代谢组学的相对定量分析。该方法首先获取标准曲线校正溶液和样本溶液的原始质谱数据,然后计算标准曲线校正样品和正负离子模式下鉴定到的同位素峰面积,并与标准曲线的校正浓度进行线性拟合,优选线性方程和同位素内标。再将样本中代谢物峰面积与标准曲线校正溶液中优选的同位素内标峰面积的比值,代入优选的线性方程,计算样本中代谢物的相对定量浓度。将代谢物精确分子量,以及 MS/MS 模式所得碎片信息在 Metlin (<http://metlin.scripps.edu>)、MoNA (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu>)和自建标准品数据库中进一步匹配注释,获得代谢物准确信息^[14]。

1.6 数据分析

依据不同阶段代谢物的相对含量,使用 R(v4.1)的 Mfuzz 包对代谢物进行聚类分析^[15]。利

用 KEGG (<http://www.genome.jp/KEGG/pathway.html>)和 R(v4.1)的 ggplot2 包对代谢物进行 KEGG 富集分析^[16-17]。使用 Excel 2016 对数据进行整理,使用 SPSS(v23.0)对数据进行 ANOVA 分析。

2 结果与分析

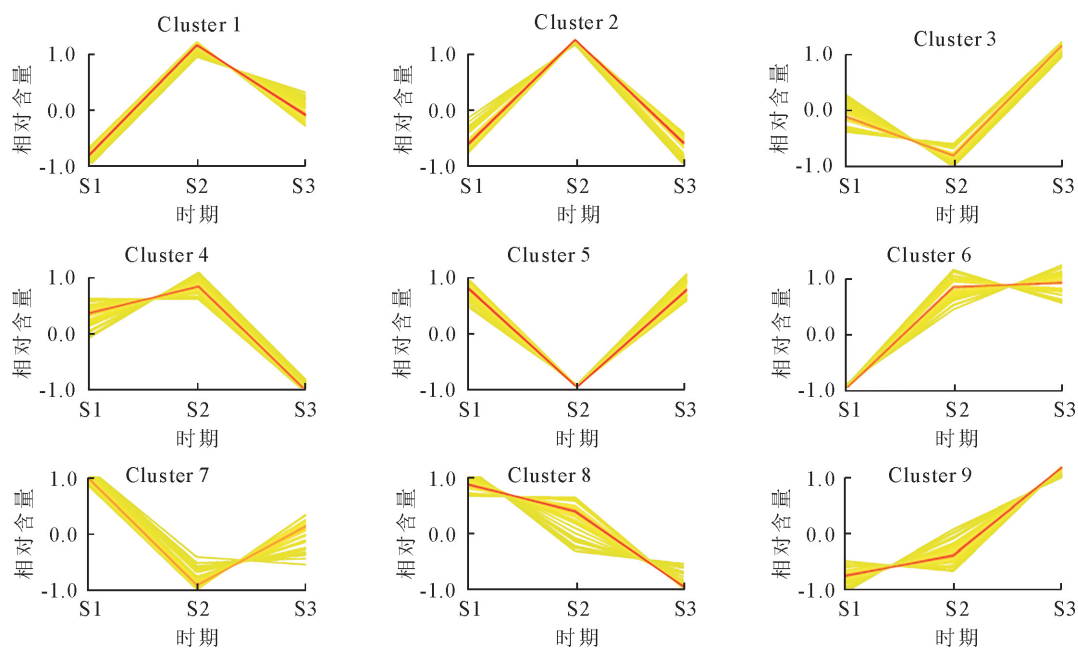
2.1 ‘胭脂红’不同发育阶段代谢物种类

经过筛选,正离子模式共获得 5 519 个前体分子,负离子模式共获得 7 010 个前体分子。共注释到 304 个代谢物,包括 64 种醇和多元醇、9 种苯二酚、15 种单萜类化合物、15 种二元羧酸及其衍生物、18 种吡啶甲酸及其衍生物、64 种氨基酸、18 种羰基化合物、37 种脂肪酸及其复合物、46 种碳水化合物及其复合物和 18 种苯甲酸及其衍生物。

2.2 ‘胭脂红’不同发育阶段代谢物聚类分析

为了进一步分析‘胭脂红’发育过程中代谢物的相对含量变化,本研究对所注释到的代谢物进行聚类分析,具有相同积累规律的代谢物会被聚到同一个簇中(图 2)。所有的代谢物被聚成 9 个簇,大致可以分为 4 种类型:持续上调(Cluster 6、Cluster 9)、持续下调(Cluster 8)、先上调后下调(Cluster 3、Cluster 5、Cluster 7)、先下调后上调(Cluster 1、Cluster 2、Cluster 4)。

Cluster 6 显示,24 个代谢物的相对含量在开花过程中呈现上升趋势,且 S1 时期至 S2 时期的上升趋势明显,S2 时期至 S3 时期的上升趋势平缓。其中,相对含量较高的代谢物有 3-羟基苯乙酸、3-羟基



注:S1.初花期;S2.盛花期;S3.末花期。

图2 ‘胭脂红’不同发育阶段代谢物聚类图

Fig. 2 Clustering map of metabolites in different developmental phases of ‘Yanzhi Hong’

丁酸、L-酪氨酸和山楂酸等。Cluster 9 显示,42 个代谢物的相对含量在开花过程中呈现上升趋势,且 S1 时期到 S2 时期的上升趋势平缓,S2 时期到 S3 时期的上升趋势明显。其中,相对含量较高的代谢物有 2-脱氢-3-脱氧-D-阿拉伯糖酸、D-木糖醇、异丁酸、L-2-羟基戊二酸和柠檬酸等。

Cluster 8 显示,41 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现下降趋势,S2 时期至 S3 时期的下降趋势较 S1 至 S2 时期幅度大。其中,相对含量较高的代谢物有琥珀酸、乙基丙二酸、茉莉酮酸甲酯、3-甲基-2-氧代戊酸、马来酸、 β -谷甾醇、红景天苷、苦杏仁苷、咖啡酸和长叶薄荷酮等;该簇包含红景天苷和苦杏仁苷等环烯醚萜。

Cluster 3 显示,32 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先下降后上升趋势,且代谢物在 S3 时期相对含量最高。其中,相对含量较高的代谢物有紫苏醇、 γ -氨基丁酸、庚二酸、肉豆蔻酸和鼠尾草酚等;该簇包含连翘酯苷 E 和 5-O-甲基维斯阿米醇苷等环烯醚萜。Cluster 5 显示,34 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先下降后上升趋势,且代谢物在 S3 时期相对含量最高。其中,相对含量较高的代谢物有 D-果糖、苯乙酸、反式-肉桂酸、氧化柠檬烯、乙酸苯酯、柠檬酸和月桂酸等。Cluster 7 显示,28 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先下降后上升趋势,且代谢物在 S1 时期相对含量最高。其中,相对含量较高的代谢物有 β -丙氨酸、焦谷氨酸、氧戊二酸、己二酸二辛酯、琥珀酸半醛、3-氨基戊二酸、富马酸和连翘酯苷等,该簇包含连翘酯苷和大车前苷等环烯醚萜。

Cluster 1 显示,36 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先上升后下降趋势,且 S3 时期代谢物的相对含量较 S1 时期高。其中,相对含量较高的代谢物有异缬草酸、3-脱氢莽草酸甲酯、桃叶珊瑚苷和棕榈酸等;该簇包含桃叶珊瑚苷这一环烯醚萜。Cluster 2 显示,37 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先上升后下降趋势,且 S1 时期代谢物的相对含量与 S3 时期相对持平。其中,相对含量较高的代谢物有 L-异亮氨酸、3-甲基-2-氧戊酸、L-赖氨酸、4-羟基肉桂酸、吡啶丙酮酸、甜菜碱和绿原酸等。Cluster 4 显示,29 种代谢物的相对含量在开花过程中呈现先上升后下降趋势,S1 时期至 S2 时期的上升趋势平缓,但 S2 时期至 S3 时期的下降趋势明显。其中,相对含量较高的代谢物有 3,4-二羟基苯基丙酸酯、醉椒素、薄荷酮、金雀异黄酮和硬脂酸等;该簇包含金雀异黄酮这一黄酮类物质。

2.3 不同聚类代谢物的代谢通路分析

利用 KEGG 数据库信息来分析‘胭脂红’不同聚类代谢物所在的生物学通路。持续上调的聚类中,Cluster 6 中的代谢物共映射到 35 条代谢通路,其中富集程度显著的有苯丙氨酸代谢途径,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径(图 3-A)。Cluster 9 富集程度显著的有抗坏血酸和藻酸盐代谢途径以及乙醛酸和二羧酸的代谢途径。持续下调的聚类中,Cluster 8 中的代谢物共映射到 30 条代谢通路,其中富集程度显著的有丁酸甲酯代谢途径,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径以及柠檬酸循环(TCA 循环)途径(图 3-B)。先下调后上调的聚类中,Cluster 3 中富集程度显著的有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径;Cluster 5 中富集程度显著的有苯丙氨酸代谢途径和 α -亚麻酸的代谢途径;Cluster 7 中的代谢物共映射到 19 条代谢通路,其中富集程度显著的有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径,嘧啶代谢途径以及酪氨酸代谢途径(图 3-C)。先上调后下调的聚类中,Cluster 1 中富集程度显著的有戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化途径以及光合生物中的碳固定途径;Cluster 2 中富集程度显著的有 β -丙氨酸代谢途径;Cluster 4 中的代谢物共映射到 22 条代谢通路,其中富集程度显著的为类单萜的生物合成途径(图 3-D)。

2.4 ‘胭脂红’不同发育阶段香气成分分析

桂花是重要的木本香花植物,而‘胭脂红’有着独特的香气,所以本研究也特别关注了其香气成分在不同发育阶段的动态变化。所测代谢物中共有 34 种与花香有关的香气成分(表 1),主要分为醇类、酮类、萜烯类、酸类和酯类等。各类香气成分的种类在不同发育阶段的差异较小,但是相对含量有着显著差异。

‘胭脂红’在不同发育阶段香气成分的相对含量不同。S1 时期检测出的香气成分相对含量最高的是紫苏醇,较高的有 3,4-二羟基苯丙酸酯、茉莉酮酸甲酯、香叶酸、己二酸二乙基己酯和胡薄荷酮;S2 时期检测出的香气成分相对含量最高的是紫苏醇,较高的有 3,4-二羟基苯丙酸酯、4-羟基苯甲酸酯、茉莉酮酸甲酯和顺式-己二烯二酸酯;S3 时期检测出的香气成分相对含量最高的是紫苏醇,较高的有香叶酸和 10-氧癸酸酯。整体来看,相对含量最高的香气成分是紫苏醇,较高的有 3,4-二羟基苯丙酸酯、香叶酸、茉莉酮酸甲酯、顺式-己二烯二酸酯和氧化柠檬烯等。

不同香气成分的相对含量积累规律也有很大区别。紫苏醇、香叶酸、鼠尾草酚、肉豆蔻酸、10-羟基硬脂酸、氧化柠檬烯、乙酸苯酯、月桂酸和反式-肉桂

酸等的相对含量先降低再升高; 顺式-己二烯二酸酯、棕榈酸、石竹烯 α -氧化物、L-香芹酮、L-薄荷酮、硬脂酸和 γ -蒎品烯等的相对含量先升高再降低; 茉莉酮酸甲酯、胡薄荷酮、咖啡酸和亚麻酸等的相对含量不断降低; 只有 10-氧癸酸酯的相对含量在发育过程中持续升高。

表 1 不同发育阶段香气成分的相对含量

Table 2 Relative content of aroma components in different developmental phases %

| 代谢物名称 | S1 相对含量 | S2 相对含量 | S3 相对含量 |
|--|----------------|--|--|
| 紫苏醇 Perillyl alcohol | 20.101±1.827 b | 12.653±1.719 c | 41.724±0.229 a |
| 3,4-二羟基苯丙酸酯 3,4-Dihydroxyphenylpropanoate | 6.329±0.547 b | 9.090±1.165 a | 1.898±0.484 c |
| 香叶酸 Geranic acid | 2.343±0.229 c | 0.927±0.032 b | 8.323±0.703 a |
| 茉莉酮酸甲酯 Methyl jasmonate | 2.705±0.002 a | 2.584±0.032 b | 1.642±0.078 c |
| 顺式-己二烯二酸酯 cis-Hexadienedioate | 1.698±0.670 a | 2.021±0.506 a | 1.726±0.314 a |
| 氧化柠檬烯 Limonene oxide | 1.822±0.042 a | 0.952±0.085 b | 1.761±0.034 a |
| 己二酸二乙基己酯 Diethylhexyl adipate | 2.115±0.235 a | 0.881±0.355 b | 1.494±0.610 ab |
| 10-氧癸酸酯 10-Oxodecanoate | 0.807±0.076 c | 1.342±0.022 b | 2.282±0.022 a |
| 胡薄荷酮 Pulegone | 2.070±0.513 a | 1.894±0.651 b | 0.419±0.075 c |
| 4-羟基苯甲酸酯 4-Hydroxybenzoate | 0.105±0.014 c | 3.271±0.249 a | 0.937±0.121 b |
| 2,3-丁二醇 2,3-Butanediol | 1.567±0.178 a | 0.929±0.202 b | 1.682±0.124 a |
| 反式-肉桂酸 trans-Cinnamate | 1.646±0.001 a | 1.457±0.268 c | 1.619±0.031 b |
| 咖啡酸 Caffeic acid | 1.159±0.178 a | 1.124±0.162 a | 0.659±0.043 a |
| 乙酸苯酯 Phenyl acetate | 1.109±0.001 a | 1.063±0.066 a | 1.099±0.012 a |
| 肉豆蔻酸 Myristic acid | 0.918±0.060 b | 0.710±0.06 b | 1.206±0.179 a |
| L-薄荷酮 L-Menthone | 1.238±0.133 a | 1.525±0.049 b | 0.005±0.001 c |
| 十六醇 Hexadecanol | 0.957±0.257 ab | 0.564±0.051 b | 1.110±0.281 a |
| 1-羟基-2-萘甲酸酯 1-Hydroxy-2-naphthoate | 1.375±0.147 a | 0.426±0.263 b | 0.757±0.226 a |
| 邻苯二甲酸二异丁酯 Diisobutyl phthalate | 0.722±0.132 b | 1.115±0.051 a | 0.596±0.077 b |
| 鼠尾草酚 Carnosol | 0.660±0.084 b | 0.076±0.002c | 1.394±0.010 a |
| 月桂酸 Dodecanoic acid | 0.917±0.066 a | 6.284×10 ⁻⁵ ±1.246×10 ⁻⁶ b | 1.038±0.191 a |
| 豆甾醇 Stigmasterol | 0.812±0.063 a | 0.157±0.019 b | 0.783±0.076 a |
| α -石竹烯 α -Caryophyllene | 0.442±0.045 b | 0.717±0.053 a | 0.442±0.076 b |
| 硬脂酸 Stearidonic acid | 0.450±0.006 b | 0.611±0.070 a | 0.338±0.023 c |
| 棕榈酸 Palmitic acid | 0.116±0.030 b | 0.375±0.065 a | 0.212±0.017 b |
| L-香芹酮 L-Carvone | 0.346±0.102 b | 0.802±0.112 a | 0.035±0.003 c |
| 2-糠酸 2-Furoic acid | 0.639±0.244 a | 0.021±0.025 b | 0.387±0.235 ab |
| 10-羟基硬脂酸 10-Hydroxystearate | 0.233±0.184 b | 0.005±0.001 b | 0.647±0.092 a |
| 3-(甲硫基)丙酸酯 3-(Methylthio) propanoate | 0.129±0.025 b | 0.579±0.056 a | — |
| 亚麻酸 Colnelenic acid | 0.420±0.058 a | 0.368±0.021 a | 0.191±0.041 b |
| 壬酸 Nonanoic acid | 0.178±0.091 ab | 0.052±0.027 b | 0.285±0.09 a |
| 邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate | 0.709±0.018 b | 1.001±0.085 a | 5.279×10 ⁻⁵ ±3.452×10 ⁻⁶ c |
| 3,4-二羟基苯基乙二醇 3,4-Dihydroxyphenylethyleneglycol | 0.214±0.047 a | 0.052±0.04 b | 0.125±0.027 ab |
| γ -蒎品烯 Gamma-terpinene | 0.533±0.023 b | 0.930±0.054 a | 0.127±0.012 c |

注:“—”代表未测得。同一行数据后标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

3 结论与讨论

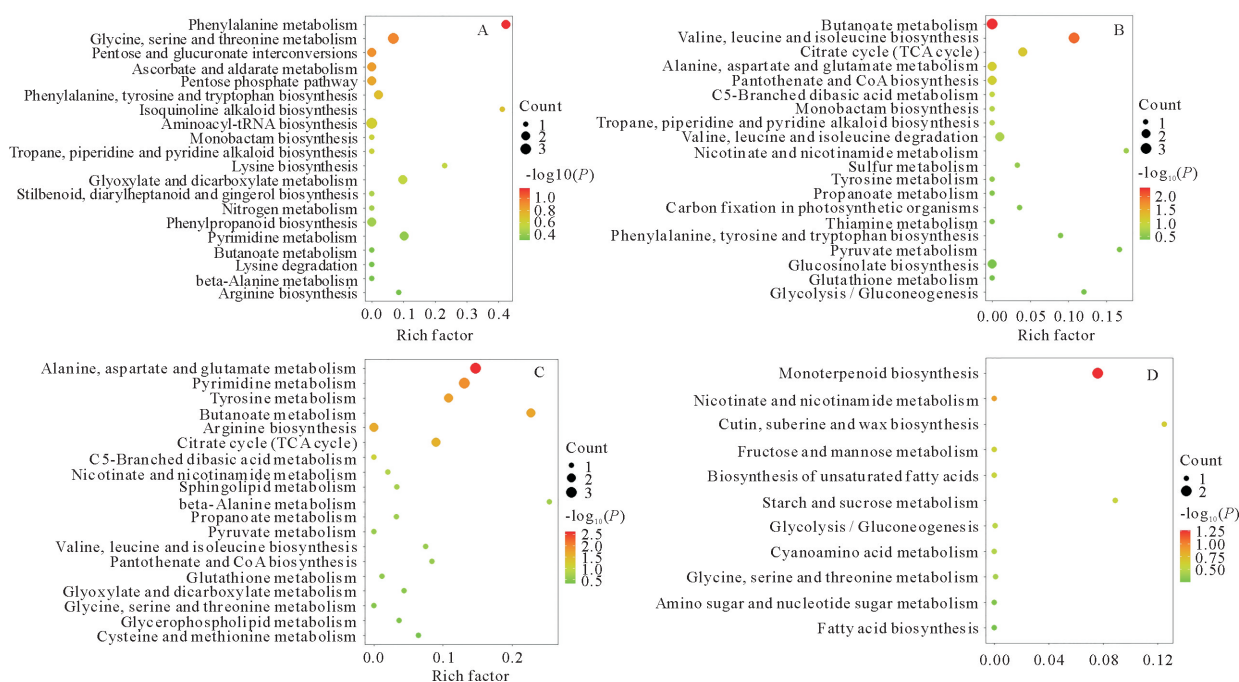
本研究基于非靶向代谢组,解析了‘胭脂红’花瓣在初花期、盛花期和末花期 3 个阶段的代谢组学动态变化规律。通过代谢物定性定量分析和聚类分析,首次在桂花中检测到了 6 种环烯醚萜和 1 种黄酮,且具有很高的药用价值。共测得 34 种香气成分,含量最高的是紫苏醇,其次是 3,4-二羟基苯丙酸酯、香叶酸和茉莉酮酸甲酯等。对不同聚类中的

代谢物进行富集分析,富集到与花香有关的苯丙氨酸代谢途径和 α -亚麻酸代谢途径,以及与花色有关的单萜生物合成途径。

通过聚类分析,大致将代谢物的时序性变化归为 4 类:持续上调、持续下调、先上调后下调和先下调后上调。本研究首次在桂花中检测到了 6 种环烯醚萜和 1 种黄酮,包括苦杏仁苷、连翘酯苷 E、5-O-甲基维斯阿米醇苷、连翘酯苷、大车前苷、桃叶珊瑚苷和金雀异黄酮。从 S1 到 S3,苦杏仁苷的相对含

量逐渐降低,连翘酯苷 E、5-O-甲基维斯阿米醇苷、连翘酯苷和大车前苷的相对含量先下降后上升,桃叶珊瑚苷和金雀异黄酮的相对含量先上升后下降。以上所检测到的环烯醚萜和黄酮类物质,具有广泛的抗氧化活性和药理作用。Zhang 等^[18]研究发现苦杏仁苷可以治疗呼吸系统疾病、改善各种肺病引起的肺损伤。韩彦琪等^[19]发现连翘酯苷 E、咖啡酸等化学成分通过作用于关键蛋白,干预了多个与清热解毒相关的生物过程,从而对 COVID-19 具有一

定的治疗作用。崔佳莹等^[20]总结,金雀异黄酮具有抗氧化、抗肿瘤、保护心血管、防治骨质疏松等药理作用,并能协同化疗药物提高化疗的效果。Sun 等^[21]发现 5-O-甲基维斯阿米醇苷通过降低炎症因子的含量,有效地逆转脂多糖 LPS 诱导的小鼠抑郁样行为。通过前人的研究,可以发现‘胭脂红’花瓣中的这类代谢物具有很高的药用价值,这表明‘胭脂红’作为桂花的新品种,其所含的化学成分也有进一步挖掘和利用的价值。



注: A. Cluster 6; B. Cluster 8; C. Cluster 7; D. Cluster 4; 点的大小代表代谢物个数,颜色代表 P 值。

图3 不同聚类中代谢物的 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of metabolites in different clusters

桂花是重要的香花树种,且‘胭脂红’有着独特的香气,所以本研究也特别关注了其香气成分的组成。将本研究所测得的 34 种香气成分的相对含量进行比较分析,结果表明相对含量最高的是紫苏醇,其次是 3,4-二羟基苯丙酸酯、香叶酸和茉莉酮酸甲酯等。施婷婷等^[22]比较分析‘波叶银桂’、‘雨城丹桂’和‘日香桂’的香气成分,发现这 3 个品种的香气成分都以芳樟醇及其氧化物、紫罗兰酮等萜类物质为主,但未测出紫苏醇、香叶酸和茉莉酮酸甲酯等。然而,张雪松等^[23]通过对金桂浸膏的香气成分进行分析,结果包含了本研究所测的‘胭脂红’花瓣的部分成分,比如紫苏醇、香叶酸、棕榈酸、亚麻酸和硬脂酸等。综合以上研究结果,‘胭脂红’有着特殊的香气成分组成,推测可能与品种、栽培条件和试验方法等多种因素有关。这个推论与张静等^[24]对不同品种牡丹香气成分分析的结论是一致的。

通过 KEGG 富集分析,本研究富集到了与花香

有关的苯丙氨酸代谢途径和 α -亚麻酸代谢途径,以及与花色有关的单萜生物合成途径。苯丙氨酸代谢途径的底物苯丙氨酸,在苯丙氨酸解氨酶的催化下生成反式-肉桂酸,反式-肉桂酸再经过一系列甲基化、酰基化等其他反应生成咖啡酸等各类芳香族化合物^[25]。然而咖啡酸等香气成分的积累规律与反式-肉桂酸差异较大,推测与该通路中其他关键基因的表达量有关。单萜生物合成途径的底物牻牛儿基焦磷酸(GPP)是萜类骨架生物合成途径的中间产物,其在四异戊二烯焦磷酸合成酶(GGPS)的催化下生成类胡萝卜素生物合成通路的底物牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)^[26]。韩远记^[27]研究表明,桂花花瓣中色素主要是类胡萝卜素,加之‘胭脂红’花瓣颜色在 S2 时期开始加深,本研究推测 S2 时期类胡萝卜素生物合成有关基因表达量较高,导致类单萜生物合成途径在 S2 时期表达量较低。

以上推测需要后续进行转录组学的分析来验

证。下一步研究中,可以将代谢组学和转录组学相结合,进一步分析特殊药物化学成分和香气成分的分子基础,解析特殊花色形成的代谢通路,为更好地挖掘和利用‘胭脂红’的药用价值,以及通过分子手段改良桂花的花色、花香提供理论依据。

参考文献:

- [1] 向其柏,刘玉莲. 中国桂花品种图志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2008.
- [2] 臧德奎,向其柏,刘玉莲,等. 中国桂花的研究历史、现状与桂花品种国际登录[J]. 植物资源与环境学报,2003(4):49-53.
- [3] 刘玉莲. 桂花品种分类及木犀属种质资源的利用[J]. 植物资源与环境,1993,2(2):44-48.
- [4] 向民,段一凡,向其柏. 木犀属品种国际登录中心年报(1)彩叶桂品种群的建立[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2014,38(1):2,187.
- [5] 尚富德,韩远记,袁王俊,等. 木犀属及桂花品种分类研究进展[J]. 河南大学学报:自然科学版,2012,42(5):608-612.
- [6] 向其柏,王贤荣,刘玉莲. 木犀属品种国际登录中心年报(2)桂花3个新品种[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2014,38(2):2,181.
- [7] HONG J, YANG L T, ZHANG D B, *et al.* Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6):767.
- [8] 杨杰,程建华,董方霆. 靶标代谢组学在不同代谢物群研究中的应用[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(3):331-337.
- YANG J, CHENG J H, DONG F T. Application of targeted metabolomics to study different metabolite groups[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2015, 42(3): 331-337. (in Chinese)
- [9] SUMNER L W, LEI Z, NIKOLAU B J, *et al.* Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects[J]. Natural Product Reports, 2015, 32(2):212-229.
- [10] DEVOS R C, MOCO S. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4):778-91.
- [11] SANGSTER, TIMOTHY. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis [J]. Analyst, 2006, 131(10): 1075-1078.
- [12] 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):1769-1780.
- [13] BENTON H P, WANT E J, EBBELS T M D. Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19):2488-2489.
- [14] SNYDER N W, KHEZAM M, MESAROS C A, *et al.* Untargeted metabolomics from biological sources using ultraperformance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) [J]. Journal of Visualized Experiments Jove, 2013(75):e50433.
- [15] LOKESH K, MATTHIAS E F. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data[J]. Bioinformatics, 2007, 2(1):5-7.
- [16] KANESHISA M, SATO Y, KAWISHIWA M, *et al.* KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(1):457-462.
- [17] GINestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis[J]. Journal of the Royal Statistical Society, 2011, 174(1):245-246.
- [18] ZHANG A, PAN W, LV J, *et al.* Protective effect of Amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways[J]. Inflammation, 2017, 40(3): 745-751.
- [19] 韩彦琪,刘耀晨,武琦,等. 基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(11):2967-2976.
- HAN Y Q, LIU Y C, WU Q, *et al.* Mechanism of Tanreqing capsule on treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(11):2967-2976. (in Chinese)
- [20] 崔佳莹,许峰巍,彭莹莹,等. 染料木黄酮抗肿瘤作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(12):2369-2375.
- [21] SUN X L, ZHANG T W, ZHAO Y, *et al.* Corrigendum to 'The protective effect of 5-O-methylvisammioside on LPS-induced depression in mice by inhibiting the over activation of BV-2 microglia through NF- κ B/I κ B- α pathway[J]. Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 2021, 85:153506-153506.
- [22] 施婷婷,杨秀莲,王良桂. 3个桂花品种花香组分动态特征及花被片结构解剖学观测[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2020, 44(4):12-20.
- SHI T T, YANG X L, WANG L G. Dynamic characteristics of floral components and anatomical observation of petals in three cultivars of *Osmanthus fragrans* [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2020, 44(4):12-20. (in Chinese)
- [23] 张雪松,裴建军,赵林果,等. 不同酶处理对桂花浸膏及精油成分的影响[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4):254-263.
- [24] 张静,周小婷,胡立盼,等. SPME-GC-MS测定不同品种牡丹花挥发性物质成分分析[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(4): 136-143.
- ZHANG J, ZHOU X T, HU L P, *et al.* SPME-GC-MS measurement of volatile in different peony varieties. [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(4):136-143. (in Chinese)
- [25] 杜丽娜,张存莉,朱玮,等. 植物次生代谢合成途径及生物学意义[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(3):150-155.
- DU L N, ZHANG C L, ZHU W, *et al.* The synthetic way and biological significance of plant secondary metabolism [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(3):150-155. (in Chinese)
- [26] 陈鹏臻. 桂花花瓣的类胡萝卜素代谢途径及其调控研究[D]. 开封:河南大学,2018.
- [27] 韩远记. 桂花花色变异的机理和不同花色品种花瓣的 cDNA-AFLP 差异分析[D]. 开封:河南大学,2014.