

基于转录组测序的蓝光补光调控三叶青叶片酚类成分生物合成途径分析

徐惠龙¹, 杨楠¹, 洪玉燕¹, 潘梦婷¹, 郭玉春², 范世明¹, 许文^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 福建农林大学农学院, 福建 福州 350002)

摘要: 分析三叶青叶片蓝光补光下酚类成分及基因表达谱的变化情况, 筛选酚类代谢相关差异表达基因, 为提高三叶青叶品质提供依据。以蓝光补光和可见光的三叶青叶片为研究材料, 蓝光补光可以显著提高新绿原酸、绿原酸和3-*O*-香豆酰奎宁酸等酚类成分含量。转录组共获得102 949条 unigenes, 其中有14 564条差异表达 unigenes。通过GO功能可分为52个亚类, 而KEGG富集分析显示差异表达基因显著富集在苯丙烷生物合成、黄酮类生物合成和异黄酮生物合成等酚类代谢途径中。在三叶青酚类成分生物合成相关通路中共鉴别出63条差异表达基因, 包含苯丙氨酸氨裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*)、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, *CAD*) 和黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, *FLS*) 等19种关键酶。本研究丰富了三叶青的遗传数据信息, 为解析蓝光促进三叶青酚类成分生物合成机制、开展三叶青分子育种奠定基础。

关键词: 三叶青; 转录组; 蓝光补光; 差异表达; 酚类合成

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2864-07

Analysis of the biosynthesis pathways of phenols in the leaves of *Tetrastigma hemsleyanum* regulated by supplemental blue light based on transcriptome sequencing

XU Hui-long¹, YANG Nan¹, HONG Yu-yan¹, PAN Meng-ting¹, GUO Yu-chun²,
FAN Shi-ming¹, XU Wen^{1*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Analyze the changes in phenolic components and gene expression profiles of *Tetrastigma hemsleyanum* leaves with supplemental blue light, and screen differentially expressed genes related to phenolic metabolism, providing a basis for improving the quality of *T. hemsleyanum* leaves. Using the leaves of *T. hemsleyanum* under supplemental blue light and visible light as research materials, the content of phenolic components such as neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and 3-*O*-coumaroyl quinic acid was significantly increased by supplemental blue light. A total of 102 949 unigenes were obtained from the transcriptome, including 14 564 differentially expressed unigenes. They can be divided into 52 subclasses by gene ontology (GO) function, kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis showed that these differentially expressed unigenes were significantly enriched in phenolic metabolic pathways such as phenylpropane biosynthesis, flavonoid biosynthesis and isoflavone biosynthesis. A total of 63 differentially expressed unigenes were identified

收稿日期: 2024-01-23; 修回日期: 2024-07-21.

基金项目: 福建省科技厅项目 (2016N0015, 2018N0012, 2021Y4015, 2021S2015, 2022N5018); 福建中医药大学校管课题 (X2021013-重点; X2023031); 厦门市科技特派员专项创新服务载体项目 (2022); 国家中医药管理局2023年中央财政转移支付地方项目《中药资源保障能力提升项目》。

*通讯作者 Tel: 86-591-22861322, E-mail: yaouxuwen@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0070

in the pathways related to the biosynthesis of phenolic components, including 19 key enzymes such as phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), cinnamyl-alcohol dehydrogenase (*CAD*), flavonol synthase (*FLS*), and so on. This study greatly enriched the genetic data information of *T. hemsleyanum* and laid a foundation for analyzing the mechanism of blue light promoting the biosynthesis of phenols and molecular breeding of *T. hemsleyanum*.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum*; transcriptome; supplemental blue light; differentially expressed gene; biosynthesis of phenols

三叶青为葡萄科植物三叶崖爬藤 (*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg), 主要分布于福建、浙江和广西等南方省区^[1,2], 以其块根或全草入药, 具有清热解毒、祛风化痰和活血止痛功效^[3], 含有机酸类、黄酮类及挥发油类成分等多种活性成分^[4-6]。三叶青叶子作为结石康胶囊、三叶青茶等多种中成药或保健食品的原料^[7], 前期课题组建立了三叶青叶的质量评价体系^[8-10]。三叶青是阴生药用植物, 30%自然全光照时, 有利于三叶青生长发育及其总黄酮的形成与累积^[11]。研究发现, 在夜晚补蓝光有助于提高朝鲜淫羊藿叶的产量和黄酮类成分含量^[12], 与白光相比, 蓝光处理下的银杏叶中总黄酮含量显著提高^[13], 同时, 蓝光补充光照可促进三叶青光合作用产物输送, 从而利于块根的形成与膨大^[14], 提示蓝光等光照条件是调控三叶青生长发育、活性成分形成与积累的重要因素, 但缺乏其调控的分子机制。本研究利用蓝光补光来培养三叶青, 对其叶片的酚类成分和转录组进行对比, 探究其在蓝光环境下的生长适应性, 为开发利用三叶青叶的潜在价值、蓝光调控的酚类成分生物合成的分子通路提供参考依据。

材料与amp;方法

仪器 Waters ACQUITY UPLC I-Class/XevoTQ-S超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国Waters公司); Waters CORTECS C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱; EX2250DZH/AD型十万分之一分析天平、AR224CN型万分之一天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]; KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司)。

样品与试剂 新绿原酸(批号: MUST-22040213, 354.095 1)、荜草苷(批号: MUST-18052203, 447.092 7)、牡荆苷(批号: MUST-16030811, 432.105 6)、3-*O*-香豆酰奎宁酸(批号: PS220411, 338.31)和牡荆素鼠李糖苷(批号: MUST-17052203, 578.519)购自成都曼思特生物科技有限公司, 绿原酸(批号: 110753-202018, 354.095 1)购自中国食品药品检定研究院。乙腈和甲醇为色谱纯(德国CNW公司); 甲酸为色谱级(阿拉丁

试剂上海有限公司); 其余试剂均为分析纯; 超纯水由Milli-Q超纯水系统制备。实验材料为课题组筛选的优良种质资源三叶青“闽选1号”扦插种苗, 由福建中医药大学范世明正高级实验师鉴定为葡萄科植物三叶崖爬藤 (*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)。于2020年5月, 在福建中医药大学药用植物园内开展实验, 选取生长一致的三叶青“闽选1号”的扦插苗(扦插6个月), 种植在以沙壤土为基质的塑料盆中, 每盆3株, 浇水后置荫棚下常规管理; 6月, 将三叶青盆栽放置于多光质培养箱(MRC-1000B-L, 宁波普朗特仪器有限公司)培养, 光周期为12 h·d⁻¹, 可见光(白光)光强为175 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度(25 ± 5) °C, 相对湿度(70 ± 5)%; 生长适应60 d后, 以白光为对照, 440~445 nm蓝光补光照射3 h。处理7 d后, 取3~5株叶片剪碎混合, 用锡纸包好并标记后放入液氮速冻, 于-80 °C冰箱保存备用。

色谱条件 Waters CORTECS C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), 以乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~0.5 min, 5% A; 0.5~1.5 min, 5% A→9% A; 1.5~4.5 min, 9% A→11% A; 4.5~6.5 min, 11% A→12.5% A; 6.5~9.6 min, 12.5% A; 9.6~10.4 min, 12.5% A→20% A; 10.4~10.5 min, 20% A→5% A; 10.5~12 min, 5% A), 流速0.2 mL·min⁻¹, 柱温45 °C, 进样体积2 μL。

质谱条件 采用电喷雾离子源正、负切换多反应监测定量模式; 毛细管电压3.5 kV(正离子模式)和-2.5 kV(负离子模式); 脱溶剂气(N₂)流速800 L·h⁻¹; 脱溶剂温度500 °C; 离子源温度150 °C; 锥孔气流(N₂)流速50 L·h⁻¹; Extractor: 3.00 V; 停留时间: 5 ms; 碰撞气体: Ar; 载气: N₂。

对照品溶液的制备 取新绿原酸、绿原酸、3-*O*-香豆酰奎宁酸、荜草苷、牡荆苷、牡荆素鼠李糖苷的对照品适量, 精密称定, 加入50%甲醇制备质量浓度为3.218、8.217、9.405、2.574、2.178、3.465 μg·mL⁻¹的单一对照品溶液, 其他浓度的对照品溶液由80%甲醇溶液稀释制得。

供试品溶液制备 样品真空冷冻干燥后用粉碎

机粉碎, 过 60 目筛, 精密取 0.1 g, 置具塞三角瓶中, 加入 80% 甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 离心 10 min ($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 吸取上清液稀释 10 倍后, 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

样品含量测定 取供试品溶液 2 μL 进样, 测定其新绿原酸、绿原酸和 3-*O*-香豆酰奎宁酸等酚类成分含量。

RNA 提取、文库构建、测序及分析 样品总 RNA 使用 Trizol 试剂 (R401-01, 南京维诺赞) 提取后, 分别检测其纯度和完整性。样品检测合格后, 委托北京诺禾致源有限公司完成转录组文库构建、测序及数据分析。采用 DESeq 软件进行差异表达基因功能注释和富集分析, 根据条件 ($q < 0.05$, Fold change > 2) 筛选酚类成分相关代谢功能及关键酶, 解析和统计参与苯丙烷、黄酮和异黄酮等酚类生物合成途径关键酶对应 unigenes 的表达情况。

荧光实时定量 PCR 验证 (qRT-PCR) 使用 Trizol 试剂 (R401-01, 南京维诺赞) 提取样品总 RNA, 用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和完整性。按照反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书合成 cDNA。基于数据库的 CDS 序列信息由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 PCR 引物, 香豆酰奎宁酸 3'-单加氧酶 (coumaroylquininate 3'-monooxygenase, *CYP98A3*) 引物序列为 F: 5'-AAGCTGAATTAGACC GTGTAATCG-3' 和 R: 5'-GCCTTAATGCCTCCTTGG TTAC-3'、过氧化物酶 (peroxidase, *POD*) 引物序列为 F: 5'-ACACCAATACACTATGAGGACAAG-3' 和 R: 5'-TCTGGAGTTC AATCTGCAATTTCT-3'、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl-alcohol dehydrogenase, *CAD*) 引物序列为 F: 5'-CCAATGGACTAACCGTAGTTGTAT-3' 和 R: 5'-TTACCTGATCGTGCCTGTTG-3', 选择 18S rRNA 作为内参基因, 引物序列为 F: 5'-ATATCCGTT-GCCGA GAGTCG-3' 和 R: 5'-CCTTCCCGATCCAA-CAACGA-3', 使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行 qRT-PCR, 3 次生物重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算关键酶基因的相对表达量。

数据处理 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行方差分析, 以进行差异统计学意义分析 ($P < 0.05$), 用 Excel 软件进行绘图。

结果与分析

1 酚类成分含量测定

建立 UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青新绿原酸、绿原酸、3-*O*-香豆酰奎宁酸、荭草苷、牡荆苷、牡荆素鼠李糖苷的含量, 结果见表 1, 发现在蓝光补光条件下新

绿原酸、绿原酸、荭草苷、牡荆苷、牡荆素鼠李糖苷和 3-*O*-香豆酰奎宁酸含量均呈上升趋势, 分别从 0.86、7.13、3.63、2.98、2.73 和 1.05 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 显著上升为 1.45、10.88、5.38、3.45、3.40 和 2.65 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

Table 1 Content of phenolic acids in *T. hemsleyanum* leaves. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs white light

Chemical component	White light / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Blue light / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
Neochlorogenic acid	0.86 \pm 0.23	1.45 \pm 0.13*
Chlorogenic acid	7.13 \pm 0.54	10.88 \pm 0.79*
Orientin	3.63 \pm 0.93	5.38 \pm 0.23*
Vitexin	2.98 \pm 0.08	3.45 \pm 0.09*
Vitexin-2- <i>O</i> -rhamnoside	2.73 \pm 0.11	3.40 \pm 0.12*
3- <i>O</i> -Coumaroyl quinic acid	1.05 \pm 0.15	2.65 \pm 0.41*

2 转录组测序与注释

获得三叶青高质量序列 (clean reads) 24 663 266~30 746 675 条, Q20 (碱基量 $\geq 20\%$) 为 95.87%~97.18%, Q30 (碱基量 $\geq 30\%$) 为 90.53%~92.38%, 见表 2。结果说明, 所获得的转录组测序质量较高, 符合后续数据组装分析的要求。

Table 2 RNA-seq data of samples

Sample No.	Total reads /strip	Clean reads /strip	Q20/%	Q30/%
White light-1	26 554 347	25 568 464	97.18	92.38
White light-2	30 746 675	29 588 801	96.27	90.53
White light-3	24 663 266	23 754 084	96.66	91.42
Blue light-1	26 228 267	24 965 094	96.50	91.33
Blue light-2	29 843 464	28 411 599	96.69	91.59
Blue light-3	29 608 714	28 728 138	95.87	92.06

转录本经 *de novo* 组装, 获得 102 949 条 unigenes。在 non-redundant protein sequence database、nucleotide sequence database、universal protein、gene ontology (GO)、evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups、protein family、kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 数据库进行功能注释, 成功注释的 unigenes 数目分别为 61 845 (60.07%)、56 649 (55.03%)、36 356 (35.31%)、33 412 (32.45%)、22 976 (22.32%)、20 599 (20.01%)、12 076 (11.73%)。

3 差异表达基因功能注释和富集分析

使用 EB Seq 软件进行注释 unigenes 的差异表达分析, 与白光组相比, 蓝光组有 14 564 条 unigenes 发生了差异表达, 其中有 6 663 (45.75%) 条表达量上调, 7 901 (54.25%) 条表达量下调。

3.1 GO 分类及富集分析 有 5 965 条差异基因被注释到生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function,

MF) 3个GO类别的52个亚类。差异表达基因CC中细胞部分相关基因丰度最高, 达3 860条; 其次是细胞器, 有2 095条。BP主要聚集在细胞过程和新陈代谢过程, 涉及的基因分别有3 415和3 013条。MF中具有结合蛋白和催化活性的基因和数量较高, 分别为3 627和3 220条。

通过GO富集分析, 蓝光补光下差异基因在BP、CC和MF分别富集了299条、42条和104条功能, BP主要有胚胎根形态发生、甲状腺激素介导的信号通路调控, CC主要有MCM复合体、细胞基底部分、THO复合体, MF主要有跨膜组氨酸激酶细胞分裂素受体活性、跨膜受体组氨酸激酶活性和茉莉酸氨基合成酶活性等方面, 而酚类代谢相关的功能也有富集, 如苯丙烷代谢过程和次生代谢过程在BP中分别排在第165条和200条, 杨梅素3-*O*-葡萄糖基转移酶活性、黄酮醇3-*O*-葡萄糖基转移酶活性、槲皮素7-*O*-葡萄糖基转移酶活性和槲皮素3-*O*-葡萄糖基转移酶活性在MF中分别排在第22条、23条、41条和45条(图1)。

3.2 KEGG注释及富集分析 将差异基因在KEGG数据库进行检索, 发现共1 425个差异表达基因注释到129条通路上。通过富集分析, 共有947条差异表达基因参与植物代谢途径, 其中247条差异表达基因参与的30条通路与次生代谢产物合成相关; 在富集较显著的15条通路中, 苯丙烷生物合成(ko00940)、黄酮类化合物生物合成(ko00941)、异黄酮类化合物合成(ko00943)、二苯乙烯类化合物、二芳基庚烷类化合物和姜辣素生物合成(ko00945)等4条酚类化合物相关代谢通路, 分别排在第1、2、9、11条(图2), 说明蓝光显著调控酚类化合物代谢通路。

4 酚类生物合成通路差异表达基因分析

三叶青在蓝光补光条件下注释到了ko00940、ko00941、ko00943、ko00945、花青素合成(ko00942)和黄酮和黄酮醇生物合成(ko00944)等6条酚类化合物相关代谢途径, 共发现有63条差异表达基因, 其中有29条表达量上调, 34条表达量下调; 同时, 本研究共筛选到19种差异表达的关键酶, 其中苯丙氨酸氨裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, 1条 unigene)、肉桂酰辅酶A还原酶(cinnamoyl-CoA reductase, *CCR*, 2条 unigenes)和维西酮还原酶(vestitone reductase, *VR*, 4条 unigenes)均上调表达, 肉桂醇脱氢酶(*CAD*, 2条 unigenes)、咖啡酸3-*O*-甲基转移酶(caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, *COMT*, 1条 unigene)、阿魏酰辅酶A邻羟化酶(feruloyl-CoA ortho-hydroxylase, *F6H1*, 1条 unigene)、莽草酸*O*-羟基肉桂酰转移酶(shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase, *HCT*, 1条 unigene)、黄酮

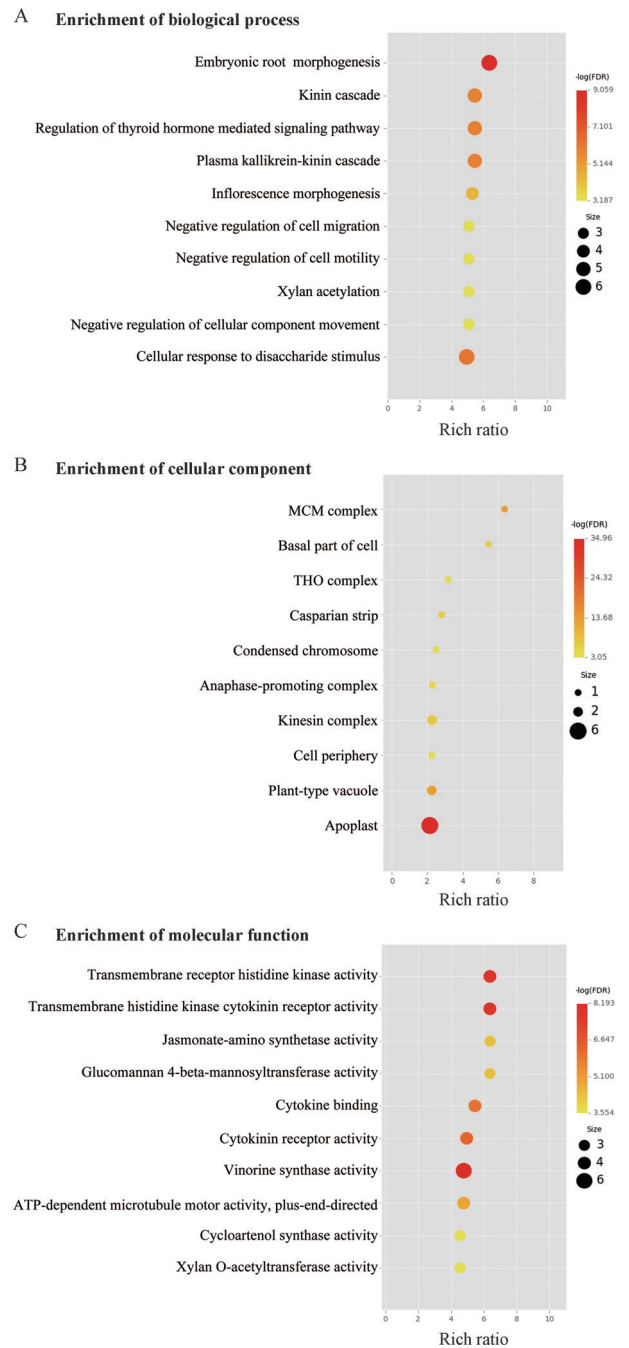


Figure 1 Bubble chart for Gene Ontology (GO) enrichment analysis of different expression genes. A: Biological process; B: Cellular component; C: Molecular function

醇合成酶(flavonol synthase, *FLS*, 2条 unigenes)、3,9-二羟基紫檀6a-单加氧酶(3,9-dihydroxypterocarpan 6a-monooxygenase, *CYP93A1*, 1条 unigene)、花青素5-*O*-葡萄糖苷-4''-*O*-丙二酰转移酶(anthocyanin 5-*O*-glucoside-4''-*O*-malonyltransferase, *5Mat2*, 3条 unigenes)、花青素5-芳香酰基转移酶(anthocyanin 5-aromatic acyltransferase, *5AT*, 1条 unigene)和黄酮醇4'-磺基转移酶(flavonol 4'-sulfotransferase, *F4-ST*, 1条 unigene)

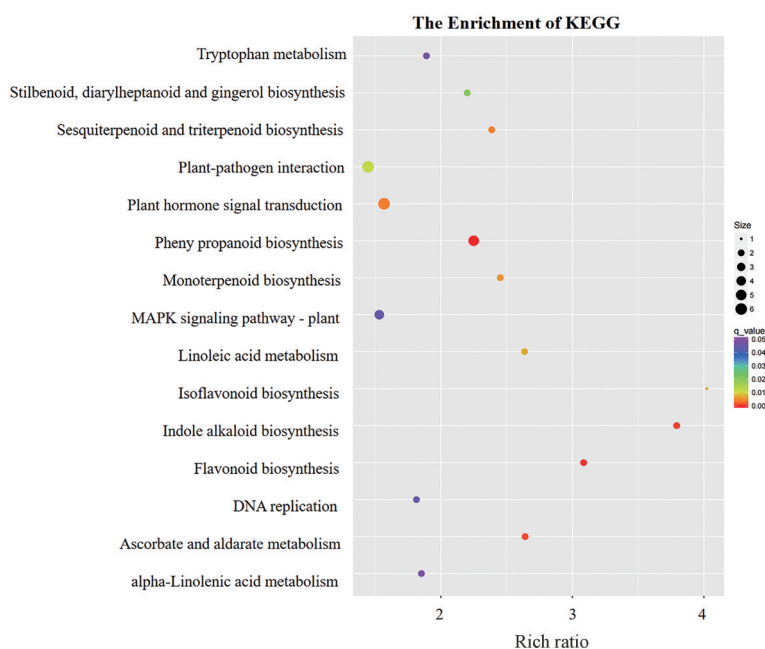


Figure 2 Bubble chart for Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of different expression genes

均下调表达, β -葡萄糖苷酶 (beta-glucosidase, *BGL*, 8条 unigenes)、过氧化物酶 (*POD*, 14条 unigenes)、咖啡酰莽草酯酶 (caffeoylshikimate esterase, *CSE*, 2条 unigenes)、咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶 (caffeoyl-CoA O-methyltransferase, *CCoAOMT*, 3条 unigenes)、香豆酰奎宁酸3'-单加氧酶 (coumaroylquinic acid 3'-monooxygenase, *CYP98A3*, 11条 unigenes)、异黄酮2'-羟化酶 (isoflavone 2'-hydroxylase, *CYP81E1_7*, 2条 unigenes)、花青素3-O-葡萄糖苷-6''-O-丙二酰转移酶 (anthocyanin 3-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase, *3MatI*, 3条 unigenes) 既有上调表达的又有下调表达的 unigene (图3)。

5 差异表达基因的验证

本研究筛选了通路中的 *CYP98A3*、*POD* 和 *CAD* 等3个关键基因进行 qRT-PCR 验证。结果表明, 三个关键基因的相对表达量和 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 趋势基本一致, 表明转录组数据可靠性较好 (图4)。

讨论

光质不仅通过调节植物中光合系统控制其生长与发育^[15], 还可以影响其次生代谢物含量及分配^[16], 通过改变光质来调控药用植物活性成分含量有可能成为一种安全生态的栽培措施, 但不同次生代谢物的合成途径对光质的响应不同。研究表明, 蓝光可促进植物形态建成及生长发育, 蓝光处理下, 罗勒提高了酚类化合物的含量, 而芝麻菜增加了类黄酮化合物的合成^[17]。与本研究结果一致, 蓝光补光可以显著提高三叶青叶

片新绿原酸、绿原酸、荭草苷等酚类的含量。以上说明光照栽培调控可促进三叶青次生代谢物的形成和累积, 这与前期研究中适度光照强度有利于三叶青黄酮类成分合成的结果相同^[11]。

通过对三叶青叶片转录组测序及数据库功能注释, 共获得了 102 949 条 unigenes, 与文献报道三叶青叶、块根的转录组学相比较^[4,18-20], 本研究功能注释的 unigenes 较多。通过研究共发现有 63 条差异表达基因参与 ko00940、ko00941、ko00943、ko00945、ko00942 和 ko00944 等 6 条酚类化合物相关代谢途径; 研究显示, 三叶青中的苯丙氨酸和酪氨酸在 *PAL*、4-香豆酸-辅酶A连接酶和查耳酮合酶等酶作用下, 催化形成香豆酰辅酶A和咖啡酰辅酶A等酚类化合物的前体, 然后这些前体进入酚类生物合成途径形成基本的酚类骨架, 经修饰形成不同种类的酚类化合物^[4,18-20]; 本研究共注释到 *BGL*、*POD* 和 *CYP98A3* 等 19 个关键酶, 其中 *PAL*、*CCR* 和 *VR* 对应的 7 条差异表达基因显著上调, *CAD*、*COMT*、*F6H1*、*HCT*、*FLS*、*CYP93A1*、*5Mat2*、*5AT* 和 *F4-ST* 对应的 13 条差异表达基因显著下调, *BGL*、*POD*、*CCoAOMT*、*CYP98A3*、*CSE*、*CYP81E1_7*、*3MatI* 对应的差异表达基因分别有 22 条显著上调和 21 条显著下调, 说明蓝光补光可以显著改变三叶青酚类生物合成途径中的关键酶表达, 如 *PAL* 是三叶青苯丙氨酸合成肉桂酸的限速酶^[4], 其在蓝光处理下表达显著上调^[21], 可以促进黄酮及酚类化合物的生物合成, 这与本研究中蓝光补光可以显著提高酚类成分的含量相吻合。

本研究通过获取三叶青在不同光质条件下的转录

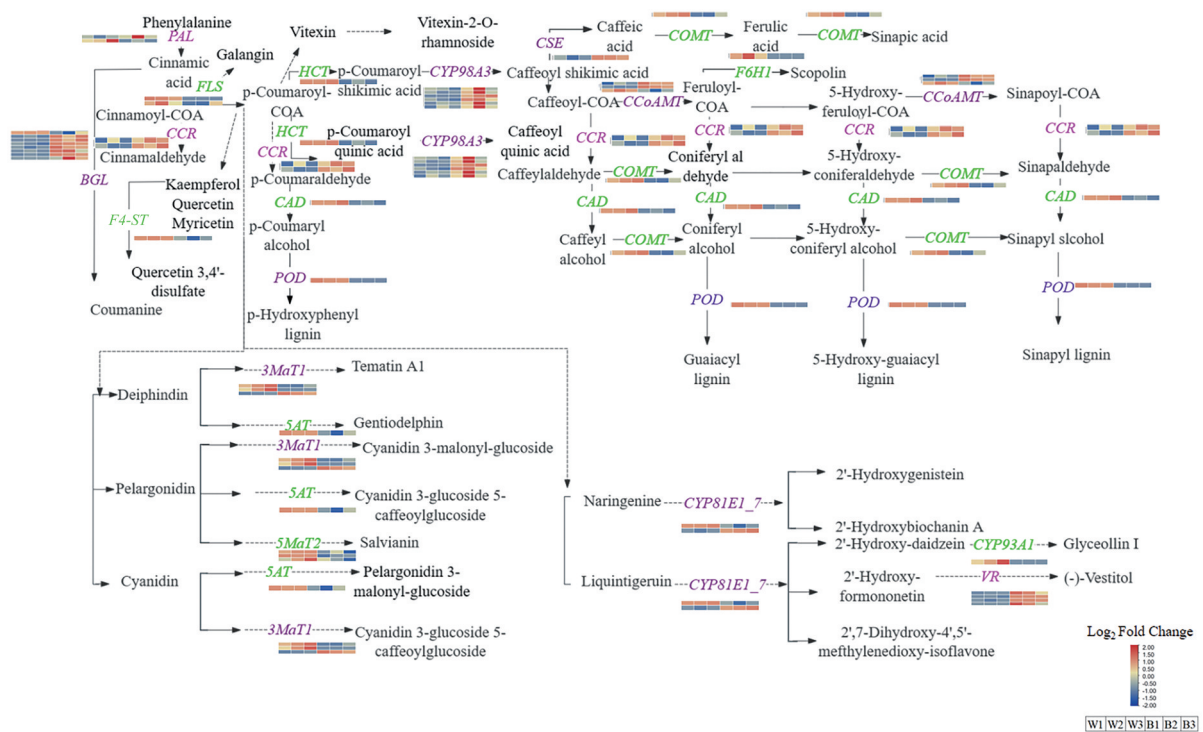


Figure 3 The biosynthesis pathways of phenols and key gene expression analysis. Differential gene expression of phenolic metabolic pathway, pink: Up-regulated genes; green: Down-regulated genes; purple: Both up-regulated and down-regulated genes; W: White light; B: Blue light. *PAL*: Phenylalanine ammonia-lyase; *BGL*: beta-Glucosidase; *POD*: Peroxidase; *CAD*: Cinnamyl-alcohol dehydrogenase; *CCoAMT*: Caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase; *CYP98A3*: Coumaroylquinic acid 3'-monooxygenase; *CCR*: Cinnamoyl-CoA reductase; *COMT*: Caffeic acid 3-*O*-methyltransferase; *CSE*: Caffeoylshikimate esterase; *F6H1*: Feruloyl-CoA ortho-hydroxylase; *HCT*: Shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase; *FLS*: Flavonol synthase; *CYP81E1_7*: Isoflavone 2'-hydroxylase; *CYP93A1*: 3,9-Dihydroxypterocarpan 6a-monooxygenase; *VR*: Vestitone reductase; *3MaT1*: Anthocyanin 3-*O*-glucoside-6''-*O*-malonyltransferase; *5MaT2*: Anthocyanin 5-*O*-glucoside-4'''-*O*-malonyltransferase; *5AT*: Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase; *F4-ST*: Flavonol 4'-sulfotransferase

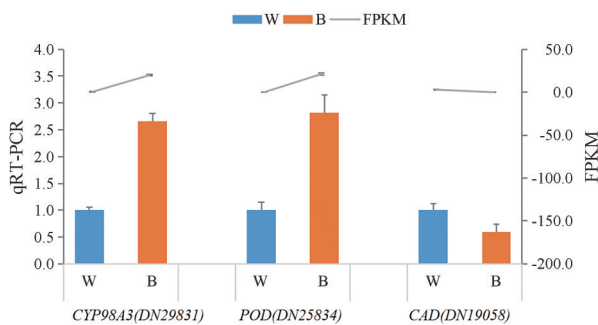


Figure 4 Expression of key genes of *CYP98A3*, *POD* and *CAD*. FPKM: Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments

组数据,对蓝光补充三叶青叶片的mRNA表达谱及酚类化合物生物合成途径中相关基因信息进行较为全面的解析,通过研究叶片酚类代谢产物含量变化及其关键酶的差异表达,为阐明蓝光调控的三叶青酚类化合物生物合成的分子通路提供参考依据。

作者贡献: 徐惠龙参与了本文的研究与书写;郭玉春研究的思路有关键贡献;杨楠、洪玉燕和潘梦婷参与了研究数

据的获取分析解释过程;范世明和许文参与起草或修改文章关键内容。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

- [1] Li CL. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1998: 122-123.
- [2] Wang YH, Jiang WM, Comes HP, et al. Molecular phylogeography and ecological niche modelling of a widespread herbaceous climber, *Tetrastigma hemsleyanum* (Vitaceae): insights into Pliopleistocene range dynamics of evergreen forest in subtropical China [J]. New Phytol, 2015, 206: 852-867.
- [3] National Chinese Herbal Medicine Compilation Compilation Group. National Chinese Herbal Medicine Compilation: Volume 1 (国家中草药汇编: 第一卷) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975: 31-32.
- [4] Yin SY, Cui HR, Zhang L, et al. Transcriptome and metabolome integrated analysis of two ecotypes of *Tetrastigma hemsleyanum* reveals candidate genes involved in chlorogenic acid accumulation [J]. Plants (Basel), 2021, 10: 1288.

- [5] Xu W, Fu ZQ, Lin J, et al. Rapid simultaneous determination of ten major flavonoids in *Tetrastigma hemsleyanum* by UPLC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1711-1717.
- [6] Zhu RY, Xu X, Ying JL, et al. The phytochemistry, pharmacology, and quality control of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg in China: a review [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 550497.
- [7] Xu W, Fu ZQ, Lin J, et al. Qualitative and quantitative studies on the main components of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg by HPLC-Q-TOF-MS and UPLC-QqQ-MS [J]. Chin J Tradit Chin Med (中国中药杂志), 2014, 39: 4365-4372.
- [8] Fan SM, Xu HL, Xie XY, et al. Study on UHPLC fingerprint and determination of eight phenolic components of *Tetrastigma hemsleyanum* leaves [J]. China J Tradit Chin Med (中国中药杂志), 2016, 41: 3975-3981.
- [9] Fan SM, Xie XY, Zeng FT, et al. Identification of chemical components and determination of flavonoids in *Tetrastigma hemsleyanum* leaves [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2017, 37: 1481-1488.
- [10] Xu HL, Xu W, Su WC, et al. Study on the correlation between genetic and chemical diversity of *Tetrastigma hemsleyanum* on the basis of ISSR and UHPLC [J]. Process Biochem, 2019, 84: 220-229.
- [11] Xu HL, Liu JM, Fan XF, et al. Effects of different light intensity on growth and total flavonoids of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2020, 22: 1746-1751.
- [12] Dai AL, Zhang YG, Ai Q, et al. Effects of different light qualities on growth, physiological characteristics and flavonoids accumulation of *Epimedium koreanum* [J]. J Agric Sci Technol (中国农业科技导报), 2022, 24: 85-92.
- [13] Wang GP, Zhang L, Cao FL, et al. Effect of red and blue light quality on growth physiological and flavonoid content of *Ginkgo biloba* seedlings [J]. J Nanjing For Univ Nat Sci Ed (南京林业大学学报 自然科学版), 2024, 48: 105-112.
- [14] Wen J, Lin GW, Liu J, et al. Cloning of early flowering genes in *Tetrastigma hemsleyanum* and its response to light quality and photoperiod signals [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2021, 21: 2245-2252.
- [15] Wang Y, Zhang YJ, He MS, et al. Effect of light quality on plant morphology and growth [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2018, 46: 22-25.
- [16] Liang ZS, Li Q, Xu WH. The effects of different light qualities on the growth, accumulation of active ingredients, and related enzyme activities of *Salvia miltiorrhiza* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 2055-2060.
- [17] Taulavuori K, Pyysalo A, Taulavuori E, et al. Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species [J]. Environ Exp Bot, 2018, 150: 183-187.
- [18] Peng X, Wu H, Chen HJ, et al. Transcriptome profiling reveals candidate flavonol-related genes of *Tetrastigma hemsleyanum* under cold stress [J]. BMC Genomics, 2019, 20: 687.
- [19] Yan JL, Qian LH, Zhu WD, et al. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome of purple and green leaves of *Tetrastigma hemsleyanum* reveals gene expression patterns involved in anthocyanin biosynthesis [J]. PLoS One, 2020, 15: e0230154.
- [20] Xiang Q, Hu S, Ligaba-Osena A, et al. Seasonal variation in transcriptomic profiling of *Tetrastigma hemsleyanum* fully developed tuberous roots enriches candidate genes in essential metabolic pathways and phytohormone signaling [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 659645.
- [21] Wu W, Luo X, Wang Y, et al. Combined metabolomics and transcriptomics analysis reveals the mechanism underlying blue light-mediated promotion of flavones and flavonols accumulation in *Ligusticum chuanxiong* Hort. Microgreens [J]. J Photochem Photobiol B, 2023, 242: 112692.