

基于广泛靶向代谢组学分析红花羊蹄甲不同部位挥发性成分差异

杨芳^{1,2†}, 江冰冰^{1,2†}, 雷金梅^{1,2},

郭存武³, 吴亚敏^{1,2}, 李宏胥^{1,2}, 王兴华^{1,2}, 王白娟^{1,2*}

¹云南农业大学茶学院 云南省高校智能有机茶园建设重点实验室; ²云南农业大学云南有机茶产业智能工程研究中心; ³云南农业大学植物保护学院 农业生物多样性应用技术国家工程研究中心, 昆明 650201

摘要: 红花羊蹄甲 (*Bauhinia blakeana* Dunn.) 兼具园林观赏及药用价值。为进一步探究红花羊蹄甲不同部位挥发性成分的差异, 利用气相色谱-质谱 (GC-MS) 广泛靶向代谢组学技术鉴定并分析叶片与花朵的挥发性成分差异。结果表明, 在叶片和花朵中共鉴定到 840 个挥发性成分, 分为萜类、酯、杂环化合物等 16 类化合物。差异代谢物在倍半萜和三萜生物合成通路中显著富集。PCA 结果表明, 红花羊蹄甲不同部位的挥发性成分之间存在差异。聚类热图结果表明, 大多数代谢物在花朵中的富集量相对较高。不同部位显著差异代谢物有 90 种, 红花羊蹄甲叶片中代谢物种类含量较高的是酮、醛类; 花朵中代谢物种类含量较高的是萜类、酯类。本研究通过对红花羊蹄甲不同部位中的挥发性成分进行全面分析和鉴定, 为后续深入挖掘和利用红花羊蹄甲中多样化的挥发性成分提供理论依据。

关键词: 红花羊蹄甲; 差异代谢物; 代谢组学分析; 挥发性成分

中图分类号: S685.99

文献标识码: A

Differential analysis of volatile metabolites in different parts of *Bauhinia blakeana* by using widely-targeted volatilomics component

YANG Fang^{1,2†}, JIANG Bing-bing^{1,2†}, LEI Jin-mei^{1,2}, GUO Cun-wu³, WU Ya-min^{1,2},
LI Hong-xu^{1,2}, WANG Xing-hua^{1,2}, WANG Bai-juan^{1,2*}

¹Key Laboratory of Intelligent Organic Tea Garden Construction in Universities of Yunnan Province, College of Tea Science, Yunnan Agricultural University; ²Yunnan Organic Tea Industry Intelligent Engineering Research Center, Yunnan Agricultural University; ³National Engineering Research Center for Applied Technology of Agricultural Biodiversity, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: *Bauhinia blakeana* Dunn. has both ornamental and medicinal value. In order to further explore the volatile metabolites in different parts of *B. blakeana*, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to identify and analyze the differences of metabolites between leaves and flowers. The results showed that a total

of 840 volatile metabolites were identified in leaves and flowers, which were divided into 16 compounds, such as terpenoids, esters, heterocyclic compounds and so on. Differential metabolites were significantly enriched in sesquiterpene and triterpene biosynthesis pathways. The results of principal component analysis showed that there were differences in volatile metabolites between different parts of *B. blakeana*. The results of cluster heat map showed that the enrichment of most metabolites in flowers was relatively high. There were 90 kinds of metabolites with significant differences in different parts. In the leaves of *B. blakeana*, the higher contents of metabolite types were ketones and aldehydes, while there were terpenoids and esters in the flowers. In this study, the metabolite types in different parts of *B. blakeana*. were comprehensively analyzed and identified, which provided a theoretical basis for the further exploration and utilization of the various of volatile components in *B. blakeana*.

Key words: *Bauhinia blakeana* Dunn.; differential metabolite; metabonomics analysis; volatile component

红花羊蹄甲 (*Bauhinia blakeana* Dunn.) 又称为洋紫荆、艳紫荆, 是豆科、羊蹄甲属植物, 原产于亚洲南部, 分布于中国西南和沿海南方等地^[1], 是羊蹄甲属中较为常见的一个品种^[2]。红花羊蹄甲综合开发价值高, 可利用性好, 兼具园林观赏及药用价值。红花羊蹄甲是常绿乔木植物, 其花大、色艳、味香、花期长, 在城市绿化中作为风景园林树种应用, 具有较好的生态价值和园林观赏价值^[3]; 在药理学研究和药用价值上, 红花羊蹄甲花瓣含有丰富的花色苷类物质, 水溶性好、色值高, 具有抗氧化及清除自由基、抗炎、抗病毒等多种生物活性^[4]。此外, 红花羊蹄甲的叶、根、树皮、种子等含有抑菌活性物质, 可做药用, 具有健脾燥湿、消炎等功效^[5,6]。

植物挥发性物质是植物体内含有的具有较强气味的化合物, 具有抗菌消炎、舒缓情绪、改善呼吸道疾病等多种药用价值。植物挥发性成分的含量和组成与组织部位密切相关, 邓淼等^[7]对囊荷不同部位的挥发性成分分析, 结果表明烯烃类和醇类化合物是各部位中的主要挥发性化合物, 不同组织部位均含有其特殊的挥发性成分; Yi 等^[8]研究发现, 白术不同部位的挥发性成分及含量各不相同, 其中叶部挥发性成分组成丰富, 萜烯类化合物是其主要的挥发性成分, 在医药、食品、农业等领域具有潜在的开发利用价值。

目前国内已开展的有关红花羊蹄甲的研究报道较少, 且主要集中于园林绿化、抑菌活性等方面的应用, 有关红花羊蹄甲不同部位挥发性代谢物成分差异的研究未见报道。前人研究从显脉、红绒和大叶羊蹄甲茎枝和叶片中分离到抑菌活性物质^[9,10,11]; Lu 等^[2]研究发现红花羊蹄甲花提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌均有抑菌效果。Shang 等^[12]应用各种色谱技术从红绒毛羊蹄甲中分离纯化鉴定出白杨素、木犀草素、芹菜素等 11 个黄酮类成分。因此, 利用气相色谱-质谱 (GC-MS) 广泛靶向代谢组学技术鉴定并分析红花羊蹄甲叶片与花朵的代谢组分差异, 深入挖掘红花羊蹄甲中高度富集的挥发性成分, 并明确活性成分集中产生的部位, 对于深度开发和利用红花羊蹄甲资源意义重大。

广泛靶向代谢组整合了非靶向代谢组“广泛性”和靶向代谢组“准确性”检测技术等优点,深入研究生物体内代谢物的种类、含量和代谢途径。通过对代谢物进行全面的定量和定性分析,揭示生物体内代谢通路的变化,识别新的生物标志物,为研究生物体内代谢通路的调控机制提供依据。广泛靶向代谢组可以分析植物原料不同产地、不同品种之间的代谢物差异,能够评价植物原料的总体质量^[13,14,15]。

本研究拟利用广泛靶向代谢组学技术,鉴定并分析红花羊蹄甲叶片、花朵的挥发性成分,研究其多样性与富集特征,为精确挖掘和利用红花羊蹄甲不同部位挥发性成分提供理论基础和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验材料经本校植物分类学专家张雪梅副教授鉴定为红花羊蹄甲 (*Bauhinia blakeana* Dunn.)^[16],于2023年12月采自云南省昆明市盘龙区云南农业大学校园里。挑选3株十年生、健壮且无病虫害的红花羊蹄甲植株的新鲜花朵和叶片,放入50 mL离心管中,置于液氮干燥冷冻后,放入-80 °C冰箱保存。其中,花朵样品的编号为HF1、HF2、HF3,叶片的编号为HL1、HL2、HL3。

1.2 仪器与试剂

GC-MS/MS 8890-7000D: 色谱柱 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 萃取头 120 μm DVB/CWR/PDMS, 固相微萃取装置 SPME Arrow, 老化装置 Fiber Conditioning Station (Agilent 公司); 氯化钠 (色谱纯, 国药); 正己烷 (色谱纯, Merck); 标准品 (色谱纯, BioBioPha/Sigma-Aldrich)。

1.3 样品制备

从-80 °C冰箱中取出样品进行液氮研磨,涡旋混合均匀,每个样本称取约500 mg (液体1 mL)于顶空瓶中;分别加入饱和NaCl溶液,20 μL (10 μg/mL)内标溶液;全自动顶空固相微萃取 HS-SPME 进行样本萃取,以供GC-MS分析。

1.4 色谱质谱采集条件

HS-SPME 萃取条件:在60 °C恒温条件下,振荡5 min,120 μm DVB/CWR/PDMS 萃取头插入样品顶空瓶,顶空萃取15 min,于250 °C下解析5 min,然后进行GC-MS分离鉴定。采样前萃取头在250 °C下老化5 min。

色谱条件:DB-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.255 μm, Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA),载气为高纯氦气(纯度不小于99.999%),恒流流速1.2 mL/min,进样口温度250 °C,不分流进样,溶剂延迟3.5 min。程序升温:40 °C保持3.5 min,以10 °C/min升至100 °C,再以7 °C/min升至180 °C,最后以25 °C/min升至280 °C,保持5 min。

质谱条件：电子轰击离子源（EI），离子源温度 230 °C，四级杆温度 150 °C，质谱接口温度 280 °C，电子能量 70 eV，扫描方式选择离子检测模式（SIM），定性定量离子精准扫描。

1.5 数据处理

基于迈维（武汉）生物技术有限公司自建数据库 MWDB（Metware database）和代谢物信息公共数据库根据二级谱信息进行物质分析。运用 Mass Hunter 8.0 软件，处理质谱数据。使用 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal components analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等，具体参照 Zhang 等^[17]的方法。

2 结果与分析

2.1 红花羊蹄甲中挥发性成分的鉴定

通过 HS-SPME-GC-MS 对红花羊蹄甲不同部位的挥发性成分进行检测和分析，从红花羊蹄甲花朵、叶片中共鉴定出 840 种挥发性代谢物（见表 1），根据其化学性质可分为 16 大类，其中萜类、酯、杂环三类代谢物占比最高，占总代谢物的 56.9%。

表 1 红花羊蹄甲中代谢物分类

Table 1 Classification of metabolites in *B. blakeana*

种类 Class	数量 Number	占比 Proportion (%)
萜类 Terpenoids	208	24.76
酯 Esters	137	16.31
杂环化合物 Heterocyclic compounds	133	15.83
烃类 Hydrocarbons	66	7.86
酮 Ketones	62	7.38
醇 Alcohols	56	6.67
醛 Aldehydes	45	5.36
芳烃 Aromatics	43	5.12
酚 Phenols	31	3.69
酸 Acids	24	2.86
胺 Amins	12	1.43
含硫化合物 Sulfur compounds	10	1.19
含氮化合物 Nitrogen compounds	4	0.48
卤代烃 Halogenated hydrocarbons	3	0.36
醚 Ethers	3	0.36
其他 Others	3	0.36
总计 Total	840	

2.2 PCA 和聚类热图分析

为了解红花羊蹄甲中不同部位挥发性成分的差异，将样品中检测到的 840 种代谢物含量进行 PCA 分析（见图 1A），PC1 解释了原始数据集的 88.42%特征，PC2 解释了原始数据集的 5.84%特征。其中红花羊蹄甲 3 个花朵样品（HF）、3 个叶片样品（HL）和 3 个质控

样品（QC）分别独立聚在一起，不同部位的样本得到较好分离，说明红花羊蹄甲不同部位挥发性成分之间存在着差异。

利用归一化方法 UV（unit variance scaling）对代谢产物含量数据进行处理，对所有样品的代谢物进行聚类分析（见图 1B），在不同的分组模式中，叶片挥发性成分主要是酮、醛、卤代烃，花朵挥发性成分主要集中在萜类、酯、杂环化合物。

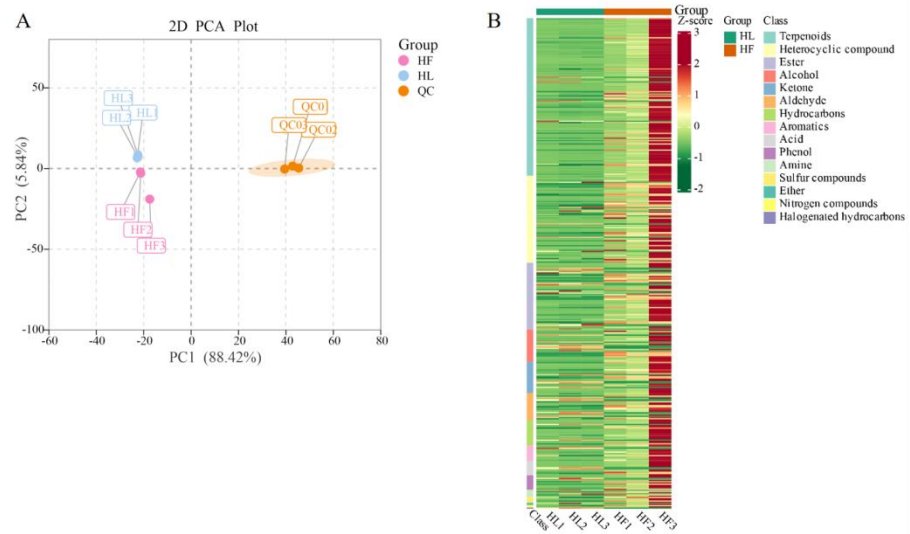


图 1 PCA 和层次聚类分析图

Fig.1 PCA and hierarchical cluster analysis

2.3 OPLS-DA 分析

采用正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）模型对红花羊蹄甲叶片、花朵进行差异检验分析（VIP ≥ 1 ），明确红花羊蹄甲不同部位之间挥发性成分的差异情况。在 OPLS-DA 得分图中（见图 2A），叶片与花朵在第一主成分轴上发生明显分离，横向距离越远说明两种代谢物之间成分具有显著差异。根据 OPLS-DA 模型分析（见图 2B）， R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 作为模型的预测参数，其中 R^2X 、 R^2Y 分别表示模型对 X 、 Y 矩阵的解释率， Q^2 表示模型的预测能力。 R^2X 为 0.742， R^2Y 等于 0.995， Q^2 是 0.901，表示模型可靠，且 $Q^2 > 0.9$ ，表明该模型非常出色，可根据其得到的 VIP 值进行差异代谢物的筛选。

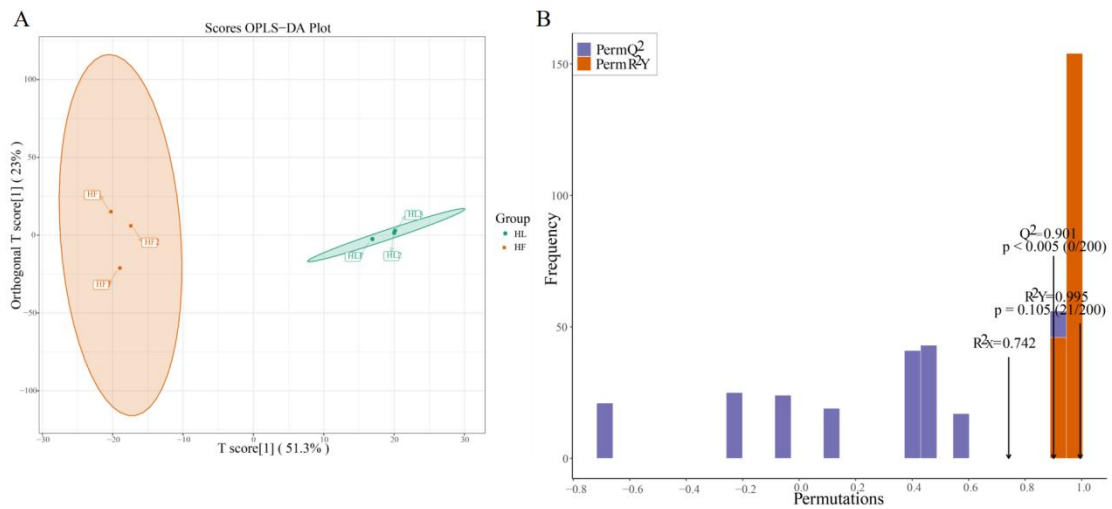


图 2 OPLS-DA 分析和模型验证

Fig.2 OPLS-DA analysis and model verification

2.4 红花羊蹄甲不同部位代谢产物分析

分别从红花羊蹄甲不同部位中筛选出代谢产物种类含量最多的三类化合物中相对含量前 5 的代谢产物（见表 2）。

表 2 不同部位中代谢物的含量

Table 2 Metabolite content in different parts

物质分类 Class	叶片 Leaf		花朵 Flower		
	化合物 Compound	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	相对含量 Relative content (%)	
酮 Ketones	4-己烯-3-酮 4-Hexen-3-one	14.26	八氢-1,2,3a, 6-四甲基-环戊[c]戊烯-3(3aH)-酮 Cyclopenta[c]pentalen-3(3aH)-one, octahydro-1,2,3a,6-tetramethyl-	1.31	
	2,2,3-三甲基环丁酮 2,2,3-Trimethylcyclobutanone	4.13	4-己烯-3-酮 4-Hexen-3-one	0.60	
	4-甲基-3-戊烯-2-酮 3-Penten-2-one,4-methyl-	0.45	1-(3-羟基苯基)-乙酮 1-(3-Hydroxyphenyl)ethanone,	0.33	
	3,5-辛二烯酮 3,5-Octadien-2-one	0.23	1-苯基-1-戊酮 Valerophenone	0.27	
	(E,E)-3,5-辛二烯-2-酮 (E,E)-3,5-Octadien-2-one	0.23	1-苯基-1,2-丙二酮 1-Phenyl-1,2-propanedione	0.26	
	醛 Aldehydes	2-己烯醛 2-Hexenal	6.33	4-甲氧基肉桂醛 4-Methoxycinnamaldehyde	1.21
		(E)-2-己烯醛 (E)-2-Hexenal	6.33	反式-4-甲氧基肉桂醛	1.21

			<i>trans</i> -4-Methoxycinnamaldehyde	
	己醛 Hexanal	4.78	(<i>E</i>)-2-己烯醛 (<i>E</i>)-2-Hexenal	0.26
	3,3-二甲基-2-氧代丁醛			
	Butanal, 3,3-dimethyl-2-oxo-, hemihydrate	1.27	2-己烯醛 2-Hexenal	0.26
	(<i>Z</i>)-6-壬醛 (<i>Z</i>)-6-Nonenal	0.25	(<i>Z</i>)-6-壬醛 (<i>Z</i>)-6-Nonenal	0.23
			2-亚龙脑烯基丁醇	
	2-呋喃甲醇	3.79	2-Ethyl-4-(2,2,3-trimethylcyclo-	3.58
	2-Furanmethanol		nt-3-en-yl)-but-2-en-1-ol	
			(<i>2E,4S,7E</i>)-4-异丙基-1,7-二	
醇	1,3-丁二醇 1,3-Butanediol	2.24	甲基环癸-2,7-二烯醇	1.15
Alcohols			(<i>2E,4S,7E</i>)-4-Isopropyl-1,7-dimet-	
			hylcyclodeca-2,7-dienol	
	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	2.24	2-呋喃甲 2-Furanmethanol	0.16
			2-(4-乙基苯氧基)-乙醇	0.08
	2-己醇 2-Hexanol	2.24	2-(4-Ethylphenoxy)ethanol	
	(<i>E</i>)-3-己烯 (<i>E</i>)-3-Hexen-1-ol	0.18	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	0.08
			(<i>Z</i>)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯	
	β -蒎烯 β -Pinene	0.61	基酯-2-甲基-丁酸	8.90
			(<i>Z</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl	
			2-methylbutyrate	
	左旋- β -蒎烯	0.61	喇叭茶醇 Ledol	6.17
	(<i>1S</i>)-(1)- β -Pinene			
	(<i>Z</i>)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯		大根香叶烯 B	5.02
萜类	基酯-2-甲基-丁酸	0.37	Germacrene B	
Terpenoids	(<i>Z</i>)-3,7-Dimethylocta-2,6-d-			
	ienyl 2-methylbutyrate			
			(<i>3E,7E</i>)-4,8,12-三甲基十三	
	α -姜黄烯 α -Curcumene	0.36	-1,3,7,11-四烯	4.42
			(<i>3E,7E</i>)-4,8,12-Trimethyltrideca-	
			1,3,7,11-tetraene	
			1,2,3,4,4a,5,8,9,12,12a-十氢	
	紫苏烯 Perillen	0.34	-1,4-甲基苯并环癸烯 1,2	3.94
			3,4,4a,5,8,9,12,12a-Decahydro-1,	
			4-methanobenzocyclodecene	
	甲酸异戊酯 Isopentyl formate	2.95	苯甲酸己酯 Hexyl benzoate	7.97
	(<i>E</i>)-2-甲基-2-丁烯酸苯甲酯		(<i>E</i>)-2-甲基-2-丁烯酸苯甲酯	0.50
	Benzyl tiglate	0.64	Benzyl tiglate	
	(<i>Z</i>)-戊-2-烯丁酸丁酯	0.37	苯甲酸苄酯	0.44
酯	(<i>Z</i>)-Pent-2-enyl butyrate		Benzyl angelate	
Esters			2-羟乙基苯甲酸酯	0.19
	苯甲酸己酯	0.32	2-Hydroxyethyl benzoate	
	Hexyl benzoate		(<i>Z</i>)-戊-2-烯丁酸丁酯	0.17
	丙烯酸甲氧基乙酯	0.27	(<i>Z</i>)-pent-2-enyl butyrate	
	2-Methoxyethyl acrylate			

	5-甲基恶唑烷	1.15	7(1H)-哌啶酮	2.25
	5-Methyloxazolidine		7(1H)-Pteridinone	
	甲基呋喃硫醇	0.93	2-甲氧基-3-甲基吡嗪	1.21
	2-Methyl-3-furanthiol		2-Methoxy-3-methylpyrazine	
	3,5-二甲基吡唑-1-羧胺		2-甲氧基-6-甲基-吡嗪	
杂环化合物	3,5-Dimethylpyrazole-1-carboxa	0.68	2-Methoxy-6-methylpyrazin	1.21
Heterocyclic	midine		e	
compounds	2-丙基-呋喃 2-Propylfuran	0.45	倍半乳糖呋喃 Sesquirosefuran	1.14
			4-乙酰基-3,5-二甲基-2-吡	
	1,3-二氢-2H-吲哚-2-酮	0.42	咯甲酸甲酯	
	Oxindole		Methyl	0.90
			4-acetyl-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-	
			2-carboxylate	

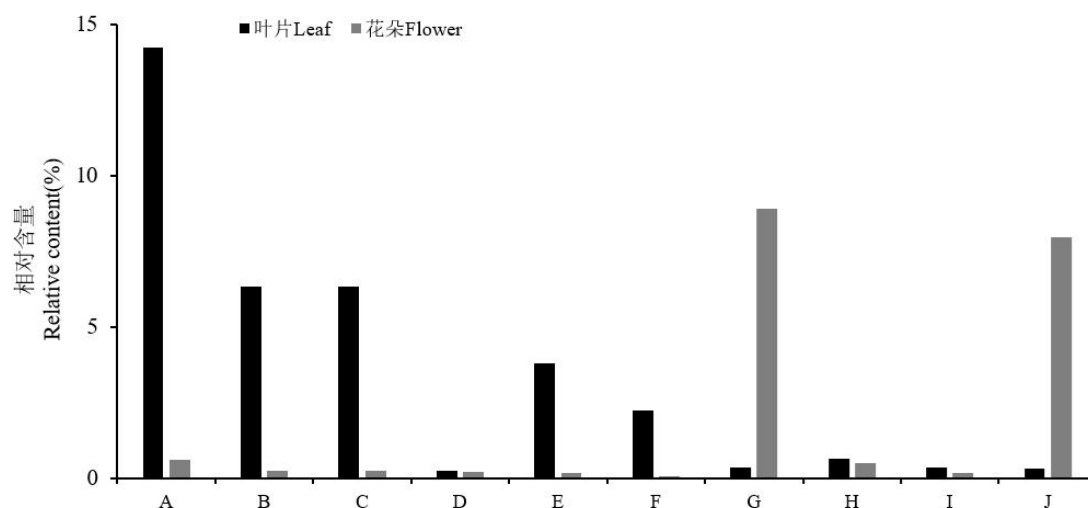


图3 同一种代谢物在不同部位中的相对含量

Fig.3 The relative content of the same metabolites in different parts

注: A: 4-己烯-3-酮; B: 2-己烯醛; C: (E)-2-己烯醛; D: (Z)-6-壬醛; E: 2-呋喃甲醇; F: 2,3-丁二醇;
G: (Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯基酯-2-甲基-丁酸; H: (E)-2-甲基-2-丁烯酸苯甲酯; I: (Z)-戊-2-烯丁酸丁酯;
J: 苯甲酸己酯

Note: A:4-Hexen-3-one;B:2-Hexenal; C:(E)-2-Hexenal; D:(Z)-6-Nonenal; E:2-Furanmethanol; F:2,3-Butanediol;
G:(Z)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl 2-methylbutyrate; H:Benzyl tiglate; I:(Z)-Pent-2-enyl butyrate; J:Hexyl benzoate.

由表2和图3可知,叶片中代谢物种类含量较高的是酮、醛和醇类化合物,相对含量较高的代谢产物是4-己烯-3-酮,其在化学工业和精细化工领域有着广泛用途^[18,19,20]。其次是2-己烯醛和(E)-2-己烯醛,其中(E)-2-己烯醛作为抗菌因子已经受到广泛关注。花朵中代谢物种类含量较高的是萜类、酯类和杂环化合物,相对含量较高的代谢产物是(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛和苯甲酸己酯,二者在花朵中的含量均高于叶片。

2.5 差异代谢物筛选

2.5.1 差异代谢物分析

将红花羊蹄甲叶片、花朵进行对比，共有 411 个差异代谢物，其中 49 个代谢物上调表达，362 个代谢物下调表达（见表 3），差异代谢物以下调模式占主导，萜类、杂环化合物、酯、醇、酮是差异代谢物的主要成分。

表 3 代谢物在各部位差异表达情况

Table 3 Differential expression of metabolites in different parts

类型 Type	叶片 vs 花朵 Leaf vs Flower		
	总数 Total	上调 Up	下调 Down
萜类 Terpenoids	132	4	128
杂环化合物 Heterocyclic compounds	73	6	67
酯 Esters	56	11	45
醇 Alcohols	27	6	21
酮 Ketones	26	4	22
醛 Aldehydes	23	6	17
烃类 Hydrocarbons	21	2	19
芳烃 Aromatics	13	2	11
酸 Acids	12	2	10
酚 Phenols	12	2	10
胺 Amines	6	2	4
含硫化合物 Sulfur compounds	5	0	5
醚 Ethers	2	1	1
含氮化合物 Nitrogen compounds	2	0	2
卤代烃 Halogenated hydrocarbons	1	1	0
其他 Others	0	0	0
总计 Total	411	49	362

2.5.2 显著差异代谢物分析

结合 P -value 值，进一步筛选出不同部位间的显著差异代谢物，认为 P -value < 0.05 的代谢物差异显著。如图 4 所示，叶片与花朵对比显著差异代谢物有 90 个（上调 25 个、下调 65 个），差异倍数前 20 差异代谢产物（见图 4 和表 4）。叶片与花朵中差异排在前 20 的代谢物均为下调代谢物，其中萜类最多，有 8 种。

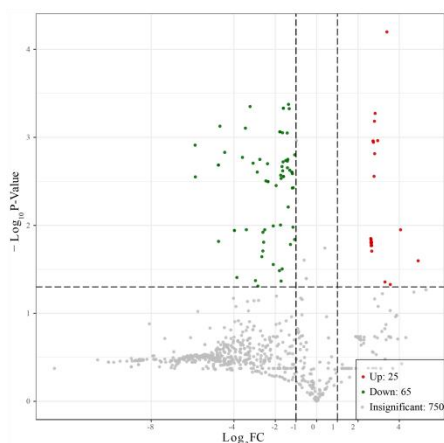


图 4 显著差异代谢物火山图

Fig.4 Significant difference in metabolite volcano map

表 4 差异倍数前 20 的代谢物

Table 4 The metabolites of the top 20 fold change

编号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	物质分类 Class	log ₂ (FC)	变化类型 Type of change
1	4-甲氧基肉桂醛 4-Methoxycinnamaldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	醛 Aldehyde	-8.65	下调
2	2-甲氧基-3-甲基吡嗪 2-Methoxy-3-methylpyrazine	C ₆ H ₈ N ₂ O	杂环化合物 Heterocyclic compound	-8.65	下调
3	喇叭茶醇 Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	萜类 Terpenoid	-8.68	下调
4	7(1H)-嘧啶酮 7(1H)-Pteridinone	C ₆ H ₄ N ₄ O	杂环化合物 Heterocyclic compound	-8.71	下调
5	2-亚龙脑烯基丁醇 2-Ethyl-4-(2,2,3-trimethylcyclopent-3-en-yl)-but-2-en-1-ol	C ₁₄ H ₂₄ O	醇 Alcohol	-8.76	下调
6	α-石竹烯醇 Caryophyllenol α-Caryophyllenol	C ₁₅ H ₂₆ O	萜类 Terpenoid	-8.78	下调
7	八氢-1,2,3a,6-四甲基-环戊[c]戊烯-3(3aH)- 酮 Cyclopenta[c]pentalen-3(3aH)-one, octahydro-1,2,3a,6-tetramethyl-	C ₁₅ H ₂₄ O	酮 Ketone	-8.78	下调
8	(2E,4S,7E)-4-异丙基-1,7-二甲基环癸-2,7- 二烯醇 (2E,4S,7E)-4-Isopropyl-1,7-dimethylcyclod eca-2,7-dienol	C ₁₅ H ₂₆ O	醇 Alcohol	-8.79	下调
9	(1S,4aR,7R)-1,4a-二甲基-7-(丙烯 基)-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘 (1S,4aR,7R)-1,4a-Dimethyl-7-(prop-1-en-2- yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-8.92	下调

	1-甲基-4-(1-甲基亚乙基)-环己醇乙酸酯					
10	1-Methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexano acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	酯 Ester	-8.97	下调	
11	乙酸松油酯 Terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	酯 Ester	-8.97	下调	
12	5,8-二乙基-十二烷 Dodecane, 5,8-diethyl-	C ₁₆ H ₃₄	烃类 Hydrocarbon	-8.97	下调	
13	1-(3-羟苯基)-乙酮 3'-Hydroxyacetophenone	C ₈ H ₈ O ₂	酮 Ketone	-9.18	下调	
14	1-(4-甲基苯基)-1-戊 1-4'-Methylvalerophenone	C ₁₂ H ₁₆ O	酮 Ketone	-9.51	下调	
15	龙吉烯 (-)-β-Longipinene (1R, 3aR, 4aR, 8aR)-1,4,4,6-四甲基 -1,2,3,3a, 4,4a, 7,8-八氢环戊[1,4]环丁[1,2] 苯	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-9.82	下调	
16	(1R,3aR,4aR,8aR)-1,4,4,6-Tetramethyl-1,2,3, 3a,4,4a,7,8-octahydrocyclopenta[1,4]cyclo buta[1,2]benzene	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-10.07	下调	
17	(+)-7-表-倍半烯 (+)-7-epi-Sesquithujene	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-10.07	下调	
18	A-柏木萜烯 (+)-α-Funebrene (1R,3aS,4aS,8aS)-1,4,4,6-四甲基 -1,2,3,3a,4,4a,7,8-八氢环戊[1,4]环丁[1,2] 苯	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-10.07	下调	
19	(1R,3aS,4aS,8aS)-1,4,4,6-Tetramethyl-1,2,3, 3a,4,4a,7,8-octahydrocyclopenta[1,4]cyclob uta[1,2]benzene	C ₁₅ H ₂₄	萜类 Terpenoid	-10.07	下调	
20	4-己基苯酚 4-Hexylphenol	C ₁₂ H ₁₈ O	酚 Phenol	-10.59	下调	

2.6 差异代谢物 KEGG 富集

差异代谢在生物体内相互作用，形成不同的通路。利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释并展示^[21]。根据差异代谢物结果，进行 KEGG 通路富集，如图 5 所示，差异代谢物主要注释和富集在倍半萜和三萜生物合成途径 (P -value<0.05)，有 7 种差异代谢物注解(表 5)，均为萜类化合物，在叶片和花朵中均下调表达，包括：长叶烯、 δ -杜松烯、 α -法呢烯、大根香叶烯 B、反式石竹烯、3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳三烯-3-醇、(E)-1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-亚烷基)环己-1-烯。

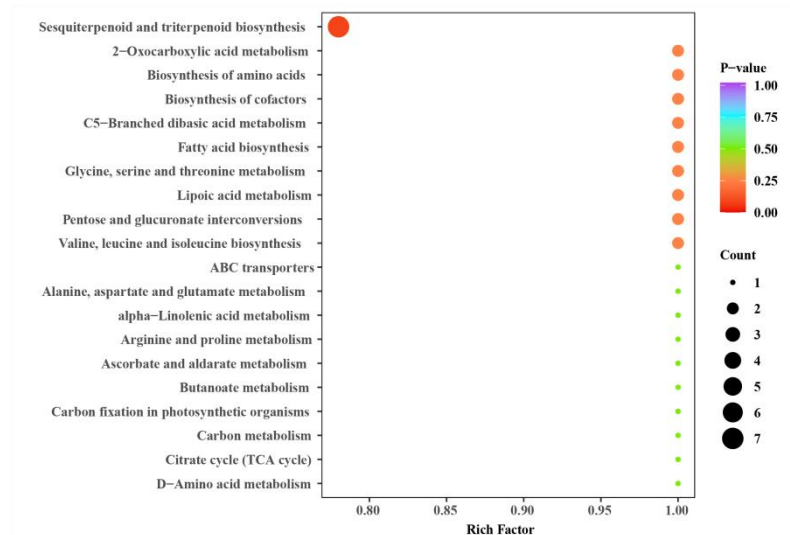


图 5 差异代谢物 KEGG 富集图

Fig. 5 KEGG enrichment of differential metabolites

表 5 富集于倍半萜和三萜生物合成通路的差异代谢物

Table 5 Differential metabolites enriched in sesquiterpene and triterpene biosynthetic pathways

编号 No.	化合物 Compound	丰度 Abundance	
		叶片 Leaf	花朵 Flower
1	长叶烯 Longifolene	11 966.44	1 192 731.80
2	δ -杜松烯 δ -Cadinene	24 111.53	2 037 616.64
3	α -法呢烯 α -Farnesene	1 992.99	67 742.42
4	大根香叶烯 B Germacrene B	60 481.65	22 183 065.98
5	反式石竹烯 Caryophyllene	7 517.06	575 303.00
6	3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳三烯-3-醇 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	1 272.72	63 596.81
7	(E)-1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-亚烷基)环己-1-烯 (E)-1-Methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-ylidene)cyclohex-1-ene	1 843.90	212 008.36

3 讨论与结论

植物在生长过程中会释放大量挥发性物质 (Volatile organic compounds, VOCs), VOCs 是植物病虫害绿色防控的重要资源^[22], 具有重要研究意义和研究前景。植物不同部位均可释放挥发性成分, 对不同部位挥发性代谢物的研究, 有助于植株不同部位的开发利用。萜类作为挥发性次生代谢物, 在自然界芳香植物中产生的生物活性物质占比最高^[23], 其不仅可作为药物开发的重要来源, 同时, 探究萜类化合物在植物生长、防御等生理功能上的作用机制, 可为进一步挖掘此类化合物在生物领域的应用提供理论依据。

本研究通过对红花羊蹄甲的叶片、花朵两个部位的挥发性成分进行全面分析和鉴定, 结果表明, 红花羊蹄甲花朵中的主要代谢产物是萜类化合物, 其相对含量高达 50.41%, 主要成分有喇叭茶醇、大根香叶烯 B、 β -蒎烯等, 喇叭茶醇具有类似橙花的香气, 用于香精和香料工业中。大根香叶烯 B 具有木质香味, 是多种植物精油的主要成分。 β -蒎烯具有强烈的松

树香味,是天然熏蒸防腐保鲜剂的理想材料,同时具有较好的生物学活性及独特的反应多样性,存在广谱抗真菌作用,能抑制多种真菌的生长,研究发现 β -蒎烯对柑橘青霉病菌表现出较好的抑制作用,在低浓度下即能有效抑制病原真菌的孢子萌发和菌丝体生长^[24]。

红花羊蹄甲叶片的主要代谢产物是酮和醛类化合物,其相对含量分别高达19.91%和19.61%,酮类化合物的主要成分是4-己烯-3-酮;醛类化合物的主要成分是(*E*)-2-己烯醛,研究发现(*E*)-2-己烯醛能够诱导植物提高对细菌和真菌病害的抗性,在植物抗病防御反应中发挥重要作用^[25]。Patrignani等^[26]证明,亚致死浓度的(*E*)-2-己烯醛能够显著改变单核增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、肠沙门氏菌和大肠杆菌生长过程中产生的细胞膜成分和挥发性化合物。Dong等^[27]研究(*E*)-2-己烯醛熏蒸处理能有效控制梨果黑斑病的扩展,对梨果黑斑病菌有抑制作用,显著抑制孢子萌发和菌丝体生长,破坏其细胞膜通透性,抑制其毒素产生。

本研究对红花羊蹄甲的叶片、花朵两个部位的挥发性成分进行代谢组学分析,共鉴定到840个挥发性成分,分为萜类、酯、杂环化合物、烃类等16类化合物。从PCA的结果可以看出,不同部位之间存在差异;聚类结果显示,大多数代谢物在花朵中的含量相对较高。红花羊蹄甲叶片与花朵的差异代谢物以下调模式占主导,其中有90种代谢物的表达发生显著变化,主要代谢产物为萜类、酮、酯、杂环化合物等。本研究为对红花羊蹄甲中挥发性成分的多样化利用提供了理论依据和数据参考。

参考文献

- 1 Gu SR,Lai Q,Zeng QB,et al.The complete plastid genome of Hong Kong Orchid Tree,*Bauhinia×blakeana* Dunn(Leguminosae)[J].Mitochondrial DNA Part B,2019,4:3454-3455.
- 2 Lu HX,Chen YH.Antimicrobial effect of ethanol extract from *Bauhinia Variegata*[J].Yulin Norm Univ(玉林师范学院学报),2008,29:87-90.
- 3 Liang LW.Isolation and identification of *Bauhinia blakeana* leaf spot pathogens and its biological control[D].Ya'an:Sichuan Agricultural University(四川农业大学),2023.
- 4 Li R,Jiang LB,Tan T,et al.Study on extraction and stability of the pigment from *Bauhinia blakeana* Dunn flower[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2013,34:326-329.
- 5 Chen DR.*Bauhinia blakeana* Dunn.(*Cercis chinensis*,*Cercis hongkongensis*,*Cercis chinensis*) Caesalpiniaceae [J].Guangdong Landscape Archit(广东园林),2006,28:63.
- 6 Hu X,Yuan SS,Ye XJ,et al.Study on extraction and antimicrobial constituents from *Bauhinia blakeana* seeds[J].Wuyi Sci(武夷科学),2017,33:101-105.
- 7 Deng M,Qin FY,Li ZY,et al.Analysis of the volatile components in different parts of *Zingiber mioga* Rosc. based on HS-SPME-GC-MS[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:1338-1347.
- 8 Yi ZR,Zhang RY,Wang JL,et al.Determination of volatile components in different parts of *Atractylodes macrocephala* Koidz. by HS-SPME-GC-MS[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1690-1698.
- 9 Shang XY,Li S,Wang YH,et al.Chemical constituents of *Bauhinia aurea*[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2006,31:1953-1955.
- 10 Tang YZ,Xing YC,Men RZ,et al.Bioactive constituents of *Bauhinia glauca* Benth.subsp.*pernervosa*[J].J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报),2014,31:188-190.

- 11 Negi BS, Dave BP, Agarwal YK. Evaluation of antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea* leaves under in vitro conditions[J]. Indian J Microbiol, 2012, 52: 360-365.
- 12 Shang XY, Li S, Wang SJ, et al. Flavonoids from *Bauhinia purpurea*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40: 196-199.
- 13 Guo F, Luo ZL, Jia XL, et al. Analysis of curcuminoids in three *Curcuma longa* L. varieties based on extensive targeted metabolomics[J]. Bio Resour(生物资源), 2022, 44: 285-295.
- 14 Lin JX, Wang PJ, Jin S, et al. Comparative analysis of black tea metabolites from different origins based on extensively targeted metabolomics[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2022, 43: 9-19.
- 15 Shao SX, Chen XM, Lin YP, et al. Widely targeted metabolomic analysis of huang guanyin oolong tea from different areas[J]. J Food Biotechnol(食品与生物技术学报), 2022, 41: 57-67.
- 16 Editorial Committee of Chinese Flora of the Chinese Academy of Sciences. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Publishing, 2001: 12.
- 17 Zhang Q, Huang SA, Lin X, et al. Analysis of primary metabolites in three plum varieties using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Sci(食品科学), 2022, 43: 226-234.
- 18 Susua C, Smolinske. CRC Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients[M]. Detroit: CRC Press, 1992: 952.
- 19 Branan AL, Davidson PM, Salminen S, et al. Food Additives[M]. New York: Taylor & Francis, 1990: 736.
- 20 Huang K, Liang QL, Hu XX, et al. Catalytic Dehydration of 3-hydroxy-2-butanone to 4-hexen-3-one[J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2015, 44: 37-40.
- 21 Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28: 27-30.
- 22 Delory BM, Delaplace P, Fauconnier ML, et al. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions?[J]. Plant Soil, 2016, 402: 1-26.
- 23 Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops[J]. Proc Biol Sci, 2007, 274: 303-313.
- 24 Shang CY. Studies about antifungal mechanism of β -pinene against *Penicillium* of *Citrus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University(华中农业大学), 2017.
- 25 Guo MR, Zhang PY, Feng GH, et al. (E)-2-Hexenal effects on tobacco antiviral and tomato postharvest disease resistance[C]//2011 Annual Meeting of Chinese Society of Plant Pathology, 2011: 395.
- 26 Siroli L, Patrignani F, Gardini F, et al. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and *trans*-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*[J]. Food Chem(食品化学), 2015, 182: 185-192.
- 27 Dong YP, Sun P, Li YC, et al. Inhibitory effect and mechanism of *trans*-2-hexenal against inoculated *Alternaria alternata* on pear fruit[J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41: 191-197.

收稿日期: 2024-04-01

接受日期:

基金项目: 云南省勐海县智慧茶产业科技特派团(202304BI090013); 云南省茶产业人工智能及大数据应用创新团队(202405AS350025); 云南省教育厅科学研究基金项目青年人才基础研究(2024J0406); 云南农业大学科研启动项目(2023-09-2022081)

†共同第一作者

*通信作者 Tel: 86-0871-65228806; E-mail: wangbaijuan2023@163.com