

引用格式:

廖李玲, 张学文, 赵燕, 陆明亮, 刘芬, 杨华. 青钱柳叶片甜味性状差异的转录组比较分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(2): 50–56.

LIAO L L, ZHANG X W, ZHAO Y, LU M L, LIU F, YANG H. Comparative transcriptome analysis of sweetness traits difference of *Cyclocarya paliurus*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(2): 50–56.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



青钱柳叶片甜味性状差异的转录组比较分析

廖李玲¹, 张学文¹, 赵燕¹, 陆明亮², 刘芬¹, 杨华^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.武冈市青钱柳茶叶有限公司, 湖南 邵阳 422400)

摘要: 以湖南武冈种植的甜型和非甜型青钱柳叶为材料, 分离其 RNA 并构建 cDNA 文库, 开展 2 种类型青钱柳的转录组测定。利用转录组数据结合萜类代谢组及其代谢途径分析, 研究青钱柳发育过程中甜味性状形成的分子差异。对甜型与非甜型青钱柳叶片转录组的差异基因 GO 及 KEGG 分析, 共鉴定出 13 个参与三萜类化合物形成的关键酶基因, 在 2 种青钱柳中具有显著差异性表达模式。结合萜类代谢检测结果, 甜型青钱柳叶中 4 类甜味三萜类化合物的积累量显著高于非甜型青钱柳叶的, 说明这些基因的差异表达造成了甜味三萜类化合物在叶片中积累量的不同, 应是青钱柳甜味性状形成的关键原因。

关键词: 青钱柳; 转录组; 三萜类化合物; 甜味性状

中图分类号: S567.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2024)02–0050–07

Comparative transcriptome analysis of sweetness traits difference of *Cyclocarya paliurus*

LIAO Liling¹, ZHANG Xuewen¹, ZHAO Yan¹, LU Mingliang², LIU Fen¹, YANG Hua^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Wugang Qingqianliu Tea Corporation, Shaoyang, Hunan 422400, China)

Abstract: In this study, leaves of sweet and non-sweet taste *Cyclocarya paliurus* leaves planted in Wugang, Hunan Province were selected for comparative study to illustrate the mechanism of sweet taste formation. The cDNA libraries were constructed and sequenced. The transcriptome data was analyzed with their terpenoid metabolome and the metabolism pathway. The molecular differences in the formation of sweetness traits of *Cyclocarya paliurus* were explored. Some 13 key enzyme genes involved in triterpene biosynthesis to have significantly different expression patterns between the two materials by GO and KEGG analysis. Combined with terpene metabolism detection, the accumulation of four kinds of sweet triterpenes in sweet *Cyclocarya paliurus* leaves was significantly higher than that in non-sweet leaves, indicating that the differential expression of these genes maybe causing different accumulation of sweet triterpenoids in leaves, it's key to the formation of sweetness traits in *Cyclocarya paliurus*.

Keywords: *Cyclocarya paliurus*; transcriptome; triterpene; sweetness traits

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)是现存胡桃科青钱柳属的单种属落叶乔木植物, 因果实呈铜钱状又被称为铜钱树或摇钱树^[1]。青钱柳叶中含有多糖、三

萜类化合物^[2]、甾体类化合物^[3]及黄酮类化合物^[4]等多种生物活性物质, 具降血糖、降血脂、降血压、抗氧化、抗衰老、增强免疫力等功能^[5–7]。

收稿日期: 2023–03–21

修回日期: 2023–12–08

基金项目: 农业农村部项目(XCZX–2023141); 湖南晒海生物科技有限公司项目(2020kjc–js170)

作者简介: 廖李玲(1998–), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学研究, 1604664645@qq.com; *通信作者, 杨华, 博士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究, yhua7710@hunau.edu.cn

青钱柳所含黄酮类化合物是由 15 个碳骨架和 2 个芳香环组成,以 2-苯基色原酮为主要母核的植物酚类中的一大类,现已鉴定出 6 000 多种^[8-9];主要以糖苷形式存在,不同黄酮母核与糖元结合的种类、数量、结合位点和方式都可能影响其药理活性^[10]。目前,从青钱柳中发现了 50 多种不同的黄酮类化合物,包括黄酮类、黄酮醇、二氢黄酮类和异黄酮类,其中山奈酚、栝素和异槲皮苷是最具代表性的成分^[11-12]。研究^[13-15]证明,青钱柳黄酮类化合物主要以增加胰岛素抵抗 3T3-L1 前脂肪细胞葡萄糖消耗、抑制 α -葡萄糖苷酶活性,达到降低血糖作用,其抗氧化黄酮成分主要是异槲皮素、金丝桃苷、山奈酚-3-O-P-D-葡萄糖苷、槲皮素、槲皮素-3-O-B-D-葡萄糖醛酸苷、山奈酚-7-O-a-L-鼠李糖苷和山奈酚等。

青钱柳叶三萜类化合物(CPT)是其重要的活性成分之一,是青钱柳降血糖等多种功能活性的重要物质基础^[16]。从青钱柳中发现的三萜化合物已达 150 种以上^[11,17]。CPT 的碳链骨架修饰方式可分为四环三萜和五环三萜:四环三萜中达玛烷型三萜皂苷和裂环达玛烷型三萜皂苷是最丰富的类型,如紫檀苷 A、紫檀苷 B、环帕利汀 A、环帕利汀 B、青钱柳素 A-N、青钱柳苷 K 和青钱柳苷 I^[18];青钱柳五环三萜化合物主要包括齐墩果烷、熊果烷、羽扇豆烷类型,如青钱柳酸 A、2 α -羟基熊果酸、阿江榄仁酸、青钱柳酸 B、麦珠子酸和羽扇豆醇等^[19]。

萜类化合物主要通过甲羟戊酸(MVA)途径和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径合成。萜类合成酶是其合成途径中的关键酶。不同的萜类合成酶催化产生不同种类的萜类物质,如香叶基香叶基焦磷酸合成酶(GGPS)催化生成二萜化合物^[20],角鲨烯合成酶(SS)催化合成三萜化合物。在倍半萜和三萜合成途径中,SS 催化法尼基二磷酸(FPP)生成角鲨烯,经角鲨烯环氧化酶(SE)环化为 2,3-角鲨烯,2,3-角鲨烯在不同环氧化鲨烯环化酶(OSC)再次环化形成不同的三萜类型化合物^[21];因此,以 SS、SE、OSC 几类酶基因作为出发点研究植物三萜类化合物是应用较为广泛的方法。

SUN 等^[22]对 CPT 的积累规律进行了基因型与三萜类化合物的关联分析,发现三萜类化合物含量较高的青钱柳类群属于一个独特的基因型亚群,可

将青钱柳分为高三萜类群和正常类群。青钱柳不同基因型亚群对总三萜类化合物积累方式不同,不同三萜类化合物个体对基因差异的变异模式不一致,高三萜类基因群紫檀苷 A 和紫檀苷 B 显著积累。青钱柳叶中含有的独特三萜化合物甜茶树甙 A^[23]、青钱柳甙 I^[24]以及紫檀苷 A、紫檀苷 B^[25]等均具有高度非热值甜味,其叶片具有独特的甜味。基于此,笔者推测具高甜度的紫檀苷 A 和紫檀苷 B 积累差异是导致不同甜味性状青钱柳叶片形成的原因,因而采用比较转录组的方法,利用 Illumina HiSeq 测序平台对甜型与非甜型青钱柳叶进行转录组测序,筛选差异基因,结合萜类代谢组学分析,旨在了解不同甜度青钱柳叶形成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

于湖南武冈青钱柳生物科技公司种植基地取甜型青钱柳幼嫩叶片(SY)和老叶(SO)、非甜型青钱柳幼嫩叶片(NY)和老叶(NO),液氮快速冷冻 15~20 min 后于-80 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 青钱柳 RNA 提取和 cDNA 文库的构建及转录组测序

12 个甜型与非甜型青钱柳叶片样本,由北京贝瑞科技有限公司进行 RNA 提取及 cDNA 文库制备,并在 Illumina 平台上进行高通量测序。

1.2.2 数据组装与功能注释

为了获得高质量的转录组序列数据,首先将下机数据经过质控过滤,得到 clean reads,再采用针对转录组拼接的软件 Trinity 对 clean reads 进行从头组装成 Unigene。然后根据 NT、NR、SwissProt、KOG、COG 数据库对 Unigene 进行注释,并对注释上的 Unigene 进行 GO 富集分析和 KEGG pathway 分析。最后对 Unigene 进行表达量和表达量差异分析,筛选出显著差异表达的基因(DEG)。

1.2.3 差异表达分析

运用 bowtie2 软件将每个样品的测序读数与文库中的 Unigene 序列进行比较,通过 FPKM 获得相应样本中的 Unigene 表达丰度信息。用错误发现率

(FDR)<0.01 和 $\log_2|\text{fold change}|>1$ 作为阈值来判断基因差异表达的显著性。

1.2.4 实时定量聚合酶链式反应验证

使用植物总 RNA 提取试剂盒(Vazyme) 提取青钱柳样本中总 RNA, 随后用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Toyobo)进行逆转录反应合成第 1 条 cDNA 链, 用于后续的 RT-PCR。选用 EIF 作为内参基因, 并选择 6 个差异基因用于检测基因表达量, 进行转录组数据验证。选择 Universal SYBR qPCR Master Mix(Biosharp)进行反应, ABI 7300 测序, 采用相对定量法计算各个基因的相对表达量。在 20 μL 反应体积中进行 qRT-PCR 扩增: 10 μL 2 \times Universal SYBR qPCR Mix、2 μL 适当稀释后 cDNA、0.4 μL ROX Reference Dye、0.5 μL 引物混合物以及 6.6 μL RNase-Free 水。循环条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 加热 2 min, 然后进行 40 个循环的两步反应(95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s 和 60 $^\circ\text{C}$ 退火及延伸 40 s), 最后通过熔解曲线分析, 验证扩增产物的特异性。每个样本设置 3 次重复。

1.2.5 甜型青钱柳与非甜型青钱柳叶片萜类代谢物的检测

采用液相色谱-质谱技术, 检测甜型和非甜型青钱柳叶片中萜类物质的积累情况。采用主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)将代谢检测数据进行可视化, 以变量权重值(VIP)>1 及差异倍数(fold change) ≥ 2 为阈值, 筛选 2 类青钱柳中的差异性显著的萜类代谢物。

2 结果与分析

2.1 Illumina 测序和从头测序组装

为了在转录水平上研究甜型与非甜型青钱柳的基因表达变化, 利用 150 个碱基的双端测序构建了 2 类青钱柳叶片 cDNA 文库。经过数据过滤和剔除低质量的读数后, 从 12 个样本中产生了 3.0338×10^8 个高质量的清洁读数, 文库的 Q20 值(序列错误率为 1%)为 95.98%~98.28%, Q30 值(序列错误率为 0.1%)为 90.18%~94.94%, GC 含量为 45.25%~46.19%, 表明 RNA-Seq 质量足够高。将 12 个转录组文库进行合并拼接, 得到 1.6×10^5 个以上 unigenes, N50 长度为 1 043 bp。

2.2 转录组注释和功能分析

将经过组装的青钱柳 Unigene 与已知 GO、KEGG、KOG、SwissProt、NT、NR 等公共数据库进行比对, 总共获得 94 696 条有同源比对信息的 Unigenes, 占总 Unigenes(162 034)的 58.44%, 其余未得到注释信息的 Unigenes(约 41.56%)可能是青钱柳特异性基因或具有未知功能的基因。其中被注释信息最多的是 NR 数据库(51.99%), 其次是 SwissProt 数据库(35.94%)、KOG 数据库(29.14%)、NT 数据库(27.75%), 与 KEGG 数据库被注释到的序列数(17.24%)相比, GO 数据库(4.29%)的信息匹配率较低, 因而选择 6 大数据库注释结果中的 5 个绘制韦恩图(图 1)。重点关注青钱柳基因的 GO 功能分类和 KEGG 代谢通路, 在 GO 富集的分子功能、生物过程以及细胞组成 3 大功能分类中, 细胞组成类的基因最多, 分子功能类基因最少。在 3 大功能分类中, 青钱柳功能基因主要集聚于细胞、细胞组分、细胞器、细胞进程、代谢进程、单生物过程、结合活性、催化活性等。KEGG 功能分类显示, 青钱柳 Unigene 分别归类于细胞信号通路 2 436 个、基因调控 11 898 个、环境调控 1 295 个、代谢 23 627 个、生物系统 1 257 个。进一步 pathway 通路富集表明, 青钱柳功能基因主要富集于翻译、碳水化合物代谢、全局和概述图谱、折叠、分选和降解、氨基酸代谢、信号转导以及萜类和聚酮类化合物的代谢等途径(图 2)。

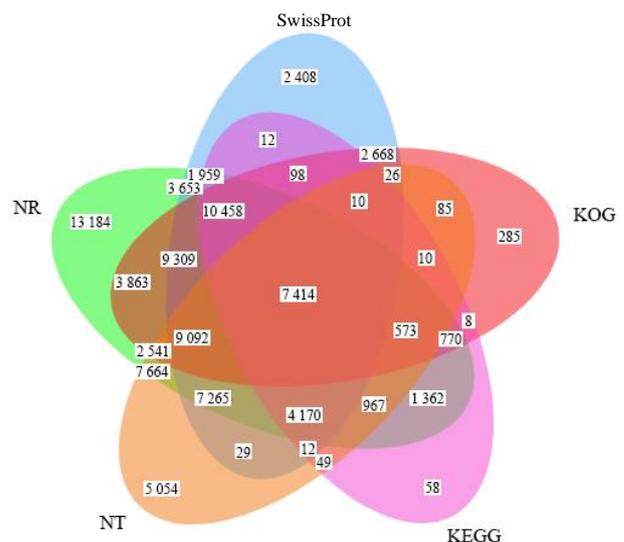


图 1 5 类数据库中转录组注释图

Fig.1 The annotated clusters of transcriptomics in five types of databases

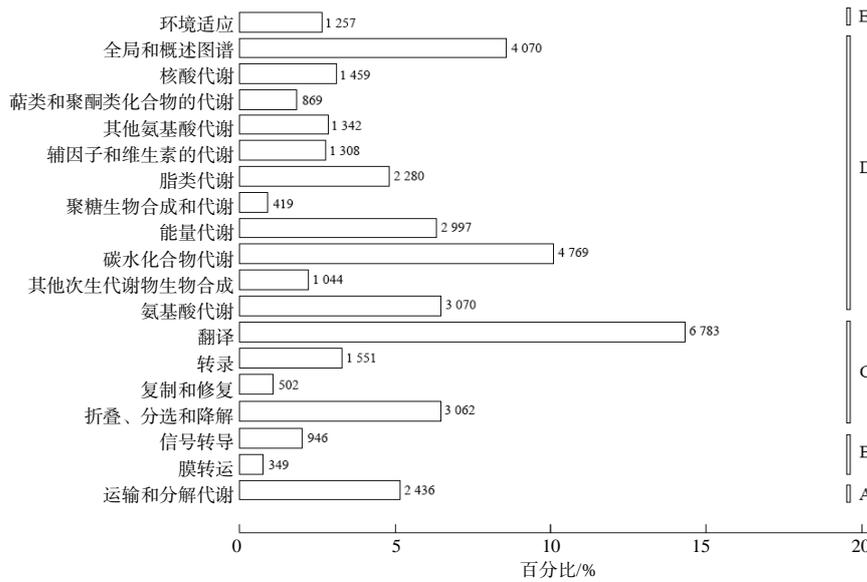


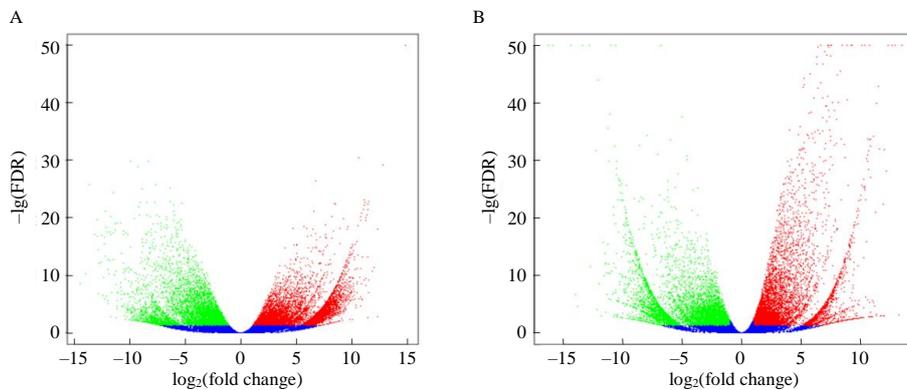
图 2 青钱柳转录组 KEGG 富集图

Fig. 2 KEGG enrichment map of transcriptomics in *Cyclocarya paliurus*

2.3 甜型与非甜型青钱柳叶的转录组差异表达

利用 edgeR 软件分析 SY、SO、NY、NO 4 类文库中基因表达量的差异，并以 $FDR < 0.01$ 和 $\log_2[\text{fold change}] > 1$ 为阈值进行 SY 与 NY、SO 与 NO 组对比分析，确定甜型与非甜型文库中的差异。

在 SY 与 NY 组中，以 NY 为对照，有 18 047 个 DEG，其中 10 371 个上调，7 676 个下调；在 SO 与 NO 组中，以 NO 为对照，有 18 037 个 DEG，其中 8 663 个上调，9 374 个下调(图 3)。



A SY 与 NY 组; B SO 与 NO 组。

图 3 青钱柳转录组 DEG 火山图

Fig. 3 DEG volcanic map of transcriptomics in *Cyclocarya paliurus*

将嫩叶组和老叶组的差异基因分别进行 GO 数据库和 KEGG 数据库比对后，采用 $P < 0.05$ 作为筛选条件，显著差异基因富集在 GO 数据库的三大功能分类中各前 20 个功能亚类，在分子功能和细胞组成的显著差异性基因占比较大，氧化还原酶活性、催化活性、蛋白泛素化相关的基因在 2 对比较组中均较为突出。甜型与非甜型青钱柳的嫩叶比较组，核糖体、苯丙烷类化合物生物合成、植物激素信号转导、光合体中碳固定、光合生物中碳固定、乙醛酸及二羧酸代谢、光合作用等途径存在差异基

因较多；而在老叶比较组内，植物-病原菌相互作用、植物激素信号转导、苯丙烷的生物合成、 α -亚麻酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、磷脂酰肌醇信号系统等途径聚集的差异基因较多。在嫩叶和老叶两组比较中，均有差异基因在植物激素信号转导、苯丙烷的生物合成、倍半萜和三萜的生物合成、黄酮类化合物的生物合成、角质素、软木脂和蜡质生物合成、光合作用-天线蛋白、泛醌和其他萜类醌的生物合成、柠檬烯和蒽烯的降解等途径中发挥重要作用。

2.4 青钱柳三萜类化合物生物合成相关候选基因

在 SY 与 NY 组、SO 与 NO 组中各鉴定出 20 多个涉及倍半萜和三萜生物合成的差异基因，其中包括 5 个角鲨烯环氧化酶(CpSE 1-5)、2 个 δ -杜松烯合酶同工酶(CpCAD1 1-2)、2 个细胞色素 P450 (CpCYP450 1-2)、以及角鲨烯合成酶(CpSS)、月桂烯合酶(CpMS)、 β -香树脂醇合成酶(Cp β -AS)、大牛儿烯-D 合成酶(CpGDS)各 1 个差异基因，在 2 组中的上调和下调趋势保持一致。此途径中，在三萜化合物形成途径起关键作用细胞色素 P450、角鲨烯合成酶、 β -香树脂醇合成酶在甜型叶片中均表现为上调差异基因，与倍半萜和单萜生物合成相关月桂烯合酶、大牛儿烯-D 合成酶则表现为下调(图 4)。

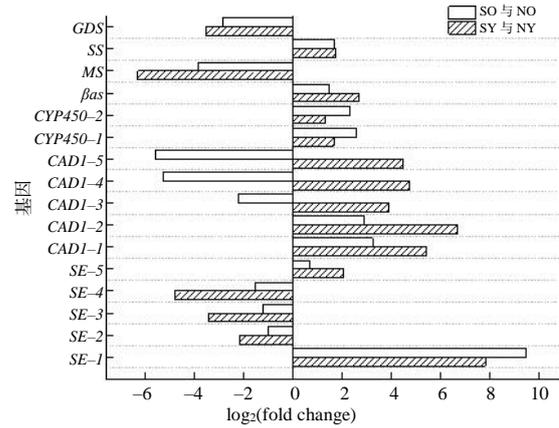
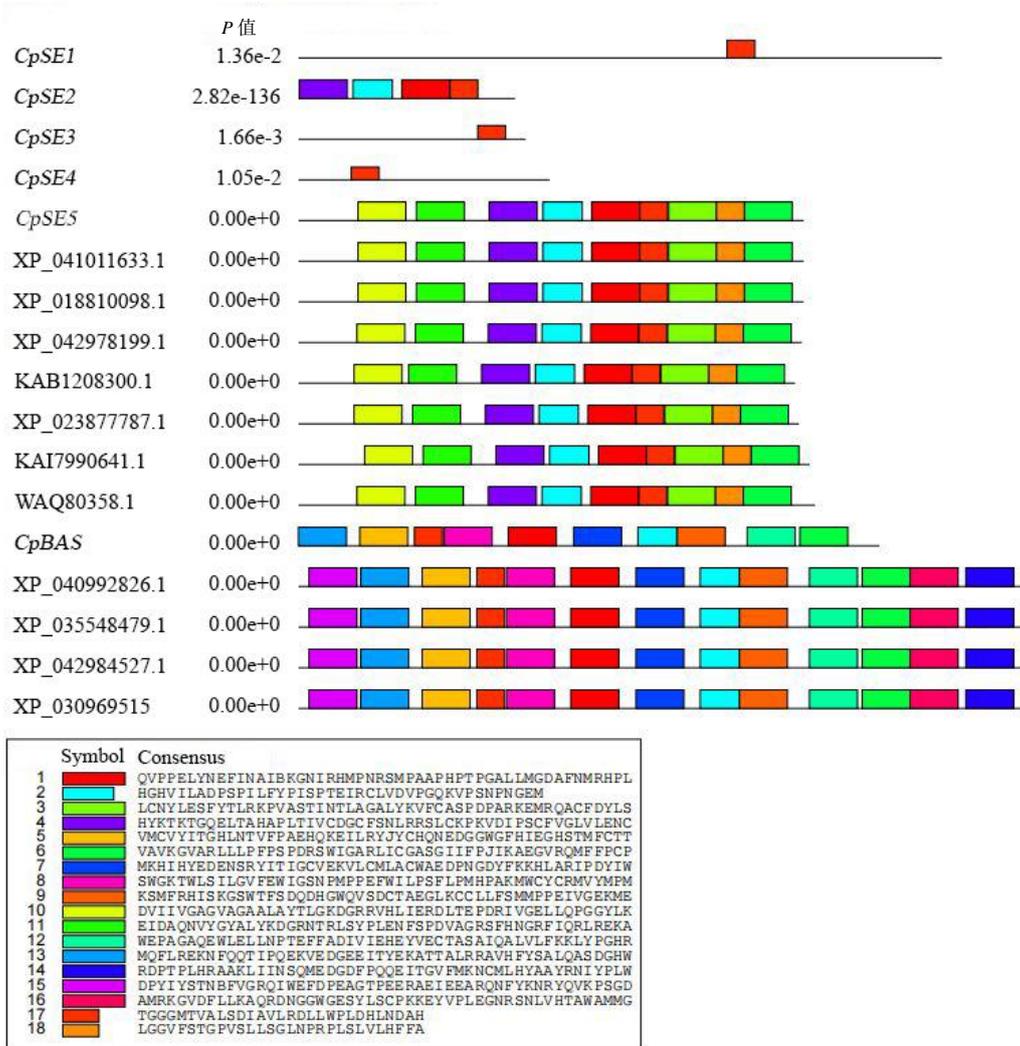


图 4 青钱柳叶三萜类生物合成关键 DEGs

Fig.4 DEGs, key to triterpene biosynthesis in *Cyclocarya paliurus*

环氧化鲨烯环化酶(OSC)在三萜类化合物结构种类多样性中发挥关键性的作用。根据在两类青钱



XP_041011633.1 SE [*Juglans microcarpa* × *Juglans regia*]; XP_018810098.1 SE [*Juglans regia*]; XP_042978199.1 SE [*Carya illinoensis*]; KAB1208300.1 SE [*Morella rubra*]; XP_023877787.1 SE [*Quercus suber*]; KAI7990641.1 SE [*Camellia lanceoleosa*]; WAQ80358.1 SE [*Cyclocarya paliurus*]; XP_040992826.1 BAS[*Juglans microcarpa* × *Juglans regia*]; XP_035548479.1 BAS[*Juglans regia*]; XP_042984527.1 BAS[*Carya illinoensis*]; XP_030969515.1 BAS[*Quercus lobata*].

图 5 青钱柳 OSC 差异基因保守基序

Fig.5 Conserved motifs analysis of OSC candidates DEGs in *Cyclocarya paliurus*

柳中所筛选出的差异基因及 cDNA 序列,选择其中的 SE 基因和 β -AS 基因,与其他物种进行同源性比较,分析其保守基序的分布,构建系统发育树。使用 NCBI Blast 对 *CpSE 1-5* 和 *Cp β -AS* cDNA 序列进行同源性分析,结果显示与小果核桃、胡桃的 SE 基因和 β -AS 基因 mRNA 序列的同源性均达 92% 以上。对 *CpSE 1-5* 和 *Cp β -AS* 氨基酸序列进行保守基序分析,在不同 OSC 家族中其结构具有相对较高的保守性,但在同一 OSC 家族中可能由于所行使功能的不同又会产生不同的结构差异。青钱柳中所获得的 5 个 SE 可以分为 2 个类型,其中 *CpSE-2* 和 *CpSE-5* 为保守性较高的 OSC,而 *CpSE-1*、*CpSE-3* 和 *CpSE-42* 体现出的 OSC 基因家族保守性较差,仅存在 1 个保守基序(图 5)。系统发育树分析则进一步验证了青钱柳与胡桃属植物 OSC 基因的亲缘关系。

2.5 qRT-PCR 验证

为进一步验证 RNA-Seq 分析的结果,在 SY 与 NY 组选择 6 个 DEG 进行 qRT-PCR,结果(图 6)显示, HMG2、SS、SE、TL1 基因在甜型青钱柳叶片中上调, BGLU12 和 SalR 基因下调,与 RNA-Seq 的 FPKM 值相比,6 个 DEG 的相对表达水平变化趋势与其基本一致。相关性分析也显示 qRT-PCR 和 RNA-Seq 两组数据之间的皮尔逊相关系数为 0.902 8,表明 RNA-Seq 数据具有良好的重复性和高可靠性。

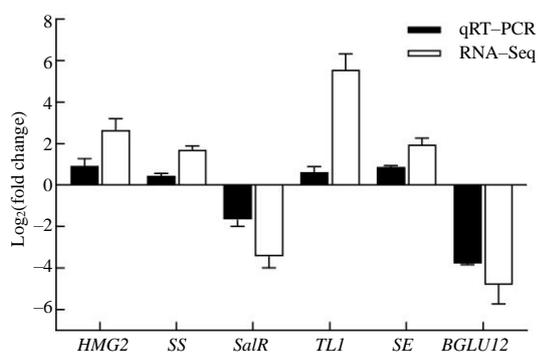


图 6 甜型与非甜型青钱柳差异基因的 qRT-PCR 验证

Fig.6 The qRT-PCR verification and analysis of DEGs in *Cyclocarya paliurus*

2.6 甜型与非甜型青钱柳叶片萜类代谢组的差异

对甜型和非甜型青钱柳叶片的萜类代谢组数据进行 PCA 分析,显示两类青钱柳叶的代谢物具有显著分离趋势(图 7)。以 NL 组为对照组,在检测到的 105 种萜类物质中,经差异代谢物筛选,甜型青钱柳叶中高积累量的有 46 种,非甜型青钱柳叶中高积累量的有 15 种,其余 44 种代谢物在两类青

钱柳叶中无显著差异。聚类热图分析也表明,同组样本能够聚类在同一簇中,具有相似的表达模式,而两类青钱柳萜类代谢物的表达量存在差异,且在甜型青钱柳叶片中各萜类物质的积累量明显高于非甜型青钱柳叶。

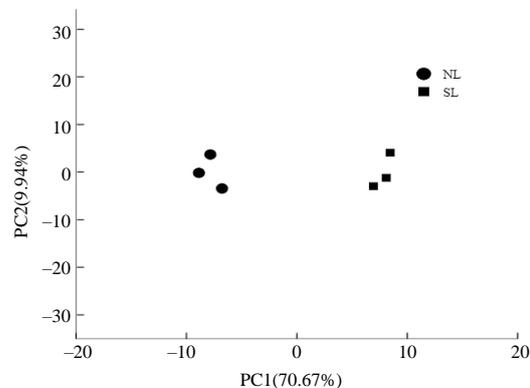


图 7 甜型与非甜型青钱柳叶萜类代谢的 PCA 分析

Fig.7 PCA plots of sweet(SL) and non-sweet(NL) *Cyclocarya paliurus*

值得关注的是,高甜度萜类化合物紫檀苷 A(Pterocaryosides A)、甜茶树甙 A(Cyclocariosid A)、紫檀苷 B(Pterocaryosides B)、青钱柳甙 I(Cyclocariosid I)在甜型青钱柳叶中的积累量是非甜型青钱柳叶的 746 倍、129 倍、55 倍、43 倍。推测甜型青钱柳叶片与非甜型青钱柳叶片间甜味性状的差异是这几类甜味化合物在甜型青钱柳中大量合成和积累所致。

3 结论与讨论

鉴于青钱柳是中国独有的极具医用和保健开发价值的植物,对青钱柳基因遗传方面的研究越来越活跃: XU 等^[26]对青钱柳叶片与愈伤组织转录组进行分析; HU 等^[27]对青钱柳叶绿体 DNA 进行了测序; ZHENG 等^[28]对四倍体青钱柳进行全基因组测序,获得约 634.90 Mb 的单倍体基因组序列; SHENG 等^[29]对不同发育阶段叶片进行联合转录组和代谢组学分析,构建了青钱柳类黄酮生物合成的调控网络。

本研究中,通过青钱柳叶片 cDNA 文库测序,经从头组装获得 162 034 个转录本,其中只有 94 696 个转录本被已知植物物种信息进行了注释,这表明青钱柳仍有未开发和未知的遗传潜力。基于 GO 和 KEGG 途径的进一步分析表明,许多基因主要涉及细胞组成、细胞过程、翻译、碳水化合物代谢、催化活性以及萜类和聚酮类化合物的代谢等。通过对甜型与非甜型青钱柳的三萜生物合成途径的比较,鉴定出角鲨烯环氧化酶、 δ -杜松烯合酶同工酶、细胞色素 P450、角鲨烯合成酶、月桂烯合成酶、 β -香树脂醇合成酶、大

牛儿烯-D 合成酶等关键差异基因,并对所筛选出的几个环氧化鲨烯环化酶进行了生物信息学分析,极大丰富了青钱柳功能基因的研究与发掘。

青钱柳中三萜化合物是其甜味性状形成的重要原因,对甜型与非甜型青钱柳叶进行了萜类代谢检测,表明甜型青钱柳中多数萜类化合物积累量显著高于非甜型青钱柳,且甜茶树甙 A、紫檀苷 A、紫檀苷 B、青钱柳甙 I 等 4 种高甜度化合物的积累量表现出在甜型青钱柳叶中上调 40~700 倍不等,这与转录组分析的在甜型青钱柳叶中有几个三萜途径合成关键酶基因表现出显著上调的表达趋势相符合。由此可以得出结论:青钱柳甜味性状形成是由甜味三萜化合物所导致,其物质积累与三萜生物合成途径的关键酶紧密相关。

参考文献:

- [1] 曾跃辉,刘新华,郑红发. 青钱柳资源利用与开发研究[J]. 湖南农业科学, 2008(4): 142-144.
- [2] SUN H H, ZHU H, WU J P, et al. Two new triterpenoid glycosides from leaves of *Cyclocarya paliurus*[J]. Natural Product Research, 2022, 36(20): 5277-5282.
- [3] 谢明勇,李磊. 青钱柳化学成分和生物活性研究概况[J]. 中草药, 2001, 32(4): 365-366.
- [4] 陈张金,余华丽,毛菊华,等. UPLC-MS/MS 同时测定青钱柳中 6 种黄酮类成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 201-206.
- [5] YU Y, SHEN M Y, WANG Z J, et al. Sulfated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* enhances the immunomodulatory activity of macrophages[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 669-676.
- [6] LIU Y, CAO Y N, FANG S Z, et al. Antidiabetic effect of *Cyclocarya paliurus* leaves depends on the contents of antihyperglycemic flavonoids and antihyperlipidemic triterpenoids[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1042.
- [7] 柳海燕,秦安琦,肖建中,等. 青钱柳的生物活性成分及其药用价值[J]. 丽水学院学报, 2019, 41(2): 36-43.
- [8] FANG S Z, YANG W X, CHU X L, et al. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus*[J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1382-1386.
- [9] MALEKI S J, CRESPO J F, CABANILLAS B. Anti-inflammatory effects of flavonoids[J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125124.
- [10] 李俊秀,廖夏云,赵立春,等. 青钱柳黄酮类成分不同提取方法及药理活性研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(5): 17-26.
- [11] QIU M, PENG J, DENG H, et al. The leaves of *Cyclocarya paliurus*: a functional tea with preventive and therapeutic potential of type 2 diabetes[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2022, 50(6): 1447-1473.
- [12] YE Z J, SUN H H, CHEN Z H, et al. Four new prenylflavonol glycosides from the leaves of *Cyclocarya paliurus*[J]. Natural Product Research, 2022, 36(3): 772-779.
- [13] 黄玲,轩彤瑶,易黎明,等. 青钱柳总黄酮对 3T3-L1 前脂肪细胞胰岛素抵抗作用研究[J]. 中南药学, 2018, 16(5): 637-640.
- [14] 王胤康,吕萌,许琦,等. 青钱柳活性成分对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量及 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 120-125.
- [15] NING Z W, ZHAI L X, HUANG T, et al. Identification of α -glucosidase inhibitors from *Cyclocarya paliurus* tea leaves using UF-UPLC-Q/TOF-MS/MS and molecular docking[J]. Food & Function, 2019, 10(4): 1893-1902.
- [16] 唐梅,赵立春,扈芷怡,等. 青钱柳化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(9): 851-859.
- [17] CHEN Z L, JIAN Y Q, WU Q, et al. *Cyclocarya paliurus*(Batalin) Iljinskaja: botany, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 285: 114912.
- [18] PENG W W, ZHAO S M, JI C J, et al. Cyclopalitins A and B, nortriterpenoids from aerial parts of *Cyclocarya paliurus*[J]. Phytochemistry Letters, 2019, 31: 114-117.
- [19] 钟瑞建,高幼衡,徐昌瑞,等. 青钱柳中五环三萜成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(7): 387-388.
- [20] 兰小中,孙敏. 红豆杉香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因克隆分析[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(4): 537-543.
- [21] 杨杰,詹亚光,肖佳雷,等. 细胞色素 P450 在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2018, 48(10): 1065-1083.
- [22] SUN C W, SHANG X L, FANG S Z, et al. Association analysis between genotype and environment: differentiation between *Cyclocarya paliurus* resources that accumulate triterpenoids[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 945897.
- [23] 杨大坚,钟焱昌,谢昭明. 甜茶树甜味成分研究[J]. 药学学报, 1992, 27(11): 841-844.
- [24] 舒任庚,徐昌瑞,黎莲娘. 青钱柳甜味成分的研究[J]. 药学学报, 1995, 30(10): 757-761.
- [25] KENNELLY E J, CAI L N, LONG L N, et al. Novel highly sweet secodamarane glycosides from *Pterocarya paliurus*[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1995, 40(10): 2602-2607.
- [26] XU X X, YIN Z P, CHEN J G, et al. De novo transcriptome assembly and annotation of the leaves and callus of *Cyclocarya paliurus*(Bata1) Iljinskaja[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160279.
- [27] HU Y H, YAN J, FENG X J, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of wheel wingnut (*Cyclocarya paliurus*), an endemic in China[J]. Conservation Genetics Resources, 2017, 9(2): 273-275.
- [28] ZHENG X H, XIAO H B, SU J Q, et al. Insights into the evolution and hypoglycemic metabolite biosynthesis of autotetraploid *Cyclocarya paliurus* by combining genomic, transcriptomic and metabolomic analyses[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 173: 114154.
- [29] SHENG X L, CHEN H W, WANG J M, et al. Joint transcriptomic and metabolic analysis of flavonoids in *Cyclocarya paliurus* leaves[J]. ACS Omega, 2021, 6(13): 9028-9038.

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:罗维