

不同发育时期核桃内果皮的差异代谢物分析

吴晓婷¹, 张泽超¹, 王红霞², 张志华²

(1. 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学山区研究所 / 河北省山区农业技术创新中心 / 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071000)

摘要: 为探明核桃内果皮发育过程中代谢物的变化和木质化发育规律, 以不同发育期的‘赞美’核桃内果皮为材料进行了代谢物测定, 同时结合转录组信息, 研究不同发育时期核桃内果皮中代谢物质的变化及相关基因的转录与表达。结果表明: 不同发育期核桃内果皮中代谢物具有显著差异。通过高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 对样品进行检测分析共鉴定出 7 837 个代谢物, 对其进行筛选后, 共得到 2 633 个差异代谢物, 包括核苷酸及其衍生物、脂质、酚酸、氨基酸及其衍生物、生物碱、糖苷、有机酸、木脂素、黄酮类等, 被注释到 35 个代谢通路中, 其中玉米素生物合成、组氨酸代谢、核黄素代谢、硫胺素代谢、苯丙氨酸和酪氨酸及色氨酸生物合成通路最显著; 硫代葡萄糖苷生物合成、嘌呤代谢、卟啉和叶绿素代谢和苯丙烷类生物合成通路富集到最多差异代谢物。花后 45 d 时, 大部分的差异代谢物的含量较花后 20 d 时降低。转录组与代谢组联合分析发现, 二者具有 22 个相同的代谢通路, 包括玉米素生物合成通路等; 激素代谢相关通路和苯丙烷生物合成相关通路中差异代谢物变化与酶编码基因的表达情况一致。核桃内果皮代谢物分析为揭示内果皮发育规律, 提高其利用价值提供了理论依据。

关键词: 核桃内果皮; 木质化; 代谢组; 差异代谢物

中图分类号: S664.1

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

文献标志码: A



Analysis of different metabolites in the endocarp of walnut at different developmental stages

WU Xiaoting¹, ZHANG Zechao¹, WANG Hongxia², ZHANG Zhihua²

(1. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Mountainous Areas Research Institute, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; Technology innovation center for agriculture in mountainous areas of Hebei province, Baoding 071001, China; National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to investigate the changes of metabolites and lignification during the development of walnut endocarp, the metabolites of walnut (‘Zanmei’) endocarp in different development stages were measured. At the same time, we combined the transcriptome information to study the changes of metabolites and expression of related genes in walnut endocarp at different development stages. The results showed that there were significant differences in the metabolites in walnut endocarp at different development stages. A total of 7837 metabolites were identified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). After screening, a total of 2633 differential

收稿日期: 2021-06-22

基金项目: 河北省现代种业科技创新专项-核桃优异多抗种质创新与新品种选育 (21326352D)。

第一作者: 吴晓婷 (1989-), 女, 河北石家庄人, 博士研究生, 主要从事干果种质资源与分子辅助育种研究。

E-mail: Wuxt365@163.com

通信作者: 张志华 (1957-), 男, 河北玉田人, 研究员, 从事果树栽培与育种研究。E-mail: zzh@hebau.edu.cn

本刊网址: <http://hauxb.hebau.edu.cn>

metabolites were obtained, including nucleotides and derivatives, lipids, phenolic acids, amino acids and derivatives, alkaloids, glycosides, organic acids, lignans, flavonoids, etc. They were classified into 35 metabolic pathways, among which, zeatin biosynthesis, histidine metabolism, riboflavin metabolism, thiamine metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis pathways were the most significant. Glucosinolates biosynthesis, purine metabolism, porphyrin and chlorophyll metabolism, and phenylpropanoid biosynthesis pathways were enriched with the most differentiated metabolites. At 45 days after anthesis, the contents of most of the differential metabolites were lower than those at 20 days after anthesis. Combined transcriptome and metabolome analysis showed that there were 22 similar metabolic pathways, including zeatin biosynthesis pathway and so on. The changes of differential metabolites in hormone metabolism and phenylpropanoid biosynthesis pathway were consistent with the expression of genes encoding the enzymes. The analysis of the metabolites in walnut endocarp provided a theoretical basis for revealing the development rule of endocarp and improving its utilization value.

Keywords: walnut endocarp; lignification; metabonomics; differential metabolites

核桃(*Juglans regia* L.)经济价值高,营养丰富,栽植区域广,是我国重要的木本油料作物之一^[1],在国内外市场具有巨大的消费潜力^[2]。在核桃生长、采收、漂洗、加工、运输和贮藏过程中,核桃硬壳发育不良易出现病果、虫果、畸形果、核桃露仁以及果仁污染的现象^[3],严重影响核桃果实品质。核桃硬壳即核桃内果皮,由多层无维管束的薄壁组织构成,薄壁组织随发育时间逐渐木质化,最终形成石细胞层^[4],主要成分为纤维素、木质素、半纤维素和多酚等^[5]。苑雅萍^[6]等通过对山核桃内果皮进行有机浸提后使用系统预试法,初步鉴定出山核桃内果皮中含多糖、强心苷、挥发油、皂苷、氨基酸、黄酮、香豆素等多种成分。郝慧娟^[7]对核桃壳提取物进行成分分析发现核桃壳中还含有胡桃醌、油酸、十八烷酸,5-羟基-1,4-萘醌等抗氧化物质,可有效清除自由基。刘丽金^[8]对核桃酚酸类成分进行研究发现,核桃壳中总酚酸含量大于核桃花粉、核桃枝、核桃花及核桃仁。

代谢组学是近年来快速发展起来的一门系统生物学学科,代谢组学技术通过对生物体中氨基酸、脂质、糖苷等全部小分子内源代谢物(<1.5 kD)进行定性和定量检测,从而反应生物体的生理状态。代谢物分析作为一种工具的使用,可以显著扩展和增强现有功能基因组学方法的能力^[9-10],是对基因组、转录组或蛋白组数据的补充^[11],在植物领域常被用于了解植物生物学特性和抗逆机制以及共生关联、发育过程等方面^[12-14]。研究人员通过代谢组学分析花椒抗性品种和感病品种茎中黄酮类化合物含量的差异,发现黄酮类化合物代谢对花椒抗性具有正向调节作用,有助于更好地理解花椒抗茎溃疡病的机理^[12]。时羽杰^[15]等对核桃内种皮进行代

谢组学分析发现了2种无性系核桃内种皮苦涩味形成的标志物及代谢物差异,为改善核桃风味提供了理论依据。陆胜波^[16]对铁核桃果实青皮和内种皮进行代谢组学分析,共检测到23类719种成分,同时发现代谢物质的变化与果实发育进程紧密相关,青皮的代谢物组分和含量差异在幼果期至果实膨大期最大。同时,各组学联合分析更为揭示植物发育规律提供了便利。然而,对核桃内果皮的研究仍然较少,其代谢组水平的探索仍属空白。

本研究以无木质素积累时期(花后20 d)和木质素快速积累期(花后45 d)的核桃内果皮为试材,利用UPLC-MS/MS进行代谢组分检测,筛选出具有显著差异的代谢物,对其相关代谢通路进行富集分析,并与转录组数据相结合,探讨核桃内果皮中代谢物变化,以期为揭示核桃内果皮发育规律和改善核桃品质研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用核桃品种为‘赞皇’(ZM),采自河北省石家庄市赞皇县榆底村核桃园,树龄7 a,管理水平一致。每个时期各选取6棵长势一致的健康正常核桃树,于花后20 d(A)和45 d(B)对树冠东南方向外围正常生长的核桃果实进行采集,用于测定的果实去掉青皮和种仁后置于液氮中带回,液氮避光研磨至较细粉末进行后续试验,每3个果实样品作为1组,每个时期选取6组进行测定(即6个生物学重复)。

1.2 试验方法

取液氮研磨后的组织100 mg,加入800 μ L体积分数为80%的甲醇提取液,涡旋震荡混合3 min,

4 ℃静置 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 0.22 μm 有机滤膜过滤后真空干燥, 100 μL 甲醇复溶, 置于样品瓶中用于 UPLC-MS 分析。

试验仪器包括高效液相色谱仪(型号 Nexera X2 system, SHIMADZU 公司, 日本)和高分辨质谱仪(型号 Triple TOF 5600+, AB SCIEX 公司, 美国)。数据采集软件: Analyst TF 1.6 和 MarkerView 1.2.1 均来自 AB SCIEX 公司(美国)分析鉴定及作图软件: MetaboAnalyst 3.0(美国)。主要试剂包括乙腈、甲醇、甲酸等购自默克公司。

色谱条件: 柱温 35 ℃(色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 3.5 μm), 进样量 3 μL, 流速 0.5 mL/min, 流动相 A: 水(0.1% 甲酸), 流动相 B: 乙腈(0.1% 甲酸), 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 色谱梯度洗脱条件

Table 1 Chromatographic gradient elution conditions

时间 /min Time	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B
0	98	2
1	98	2
13	10	90
16	10	90
16.1	98	2
20	stop	

质谱条件: 电喷雾电离 (ESI) 源, 正负离子电离模式。离子源温度 120 ℃, 脱溶剂温度 500 ℃, 脱溶剂氮气流 600 L/h, 锥孔反吹氮气 50 L/h。正负离子模式毛细管电离电压分别为 3.0 和 4.5 kV, 取

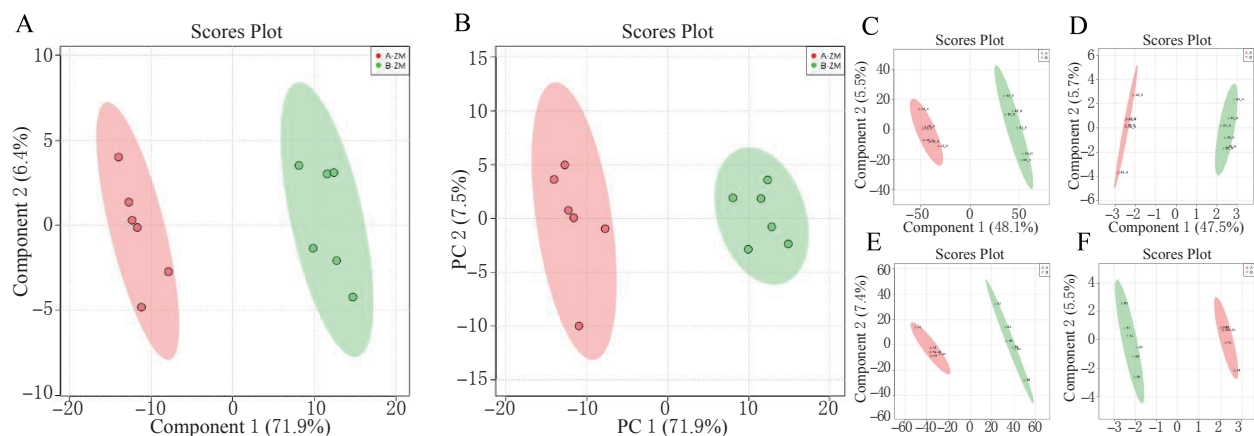
样锥孔电压为 27 eV, 萃取锥孔 4 eV, 四极杆扫描范围 50 ~ 1 500 m/z。质谱及数据标准化流程参考 Zhu^[17] 等的方法。

数据处理: 使用 MarkerView 将质谱原始数据进行峰识别、峰过滤、峰对齐等工作, 为了分析多元线性回归, 结果最终包括质核比 (m/z) 及峰面积的二维数据矩阵; 再利用 MetaboAnalyst 3.0 将不同比对要求的样本进行归一化处理。代谢物根据峰面积相对定量。

2 结果与分析

2.1 核桃内果皮代谢物差异性评价

主成分分析 (PCA) 是一种掌握事物主要矛盾的统计分析方法。图 1A 显示了 2 样本数据的主成分分析模型的得分图, 各组核桃内果皮代谢物分离明显, 花后 20 d 的内果皮样品分布于二、三象限, 花后 45 d 内果皮样品分布于一、四象限, 表明 2 组间代谢物具有较大差异。进一步使用“有监督”的偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 对 2 组数据进行分析 (图 1B), 结果发现组内数据重复性好, 2 组间数据分离良好, 具有明显不同的代谢特征, PC1 的贡献率达 71.9%, 同时引入一种变量重要性因子: 权重变异重要性排序 (Variable importance in projection, VIP), 作为后续筛选的指标之一。分别对两组中负离子 (图 1C、D) 和正离子 (图 1E、F) 进行 PLS-DA、OPLS-DA 分析, 结果与总物质分析数据一致, 各组离子重复性好, 组间差异明显。



注: 图中椭圆区域为 95% 置信区间, 括号内为各组贡献率。A、B 为总代谢物的 PCA、PLS-DA 结果, C、D 为负离子 (ESI-) 的 PLS-DA、OPLS-DA 结果, E、F 为正离子 (ESI+) 的 PLS-DA、OPLS-DA 结果。

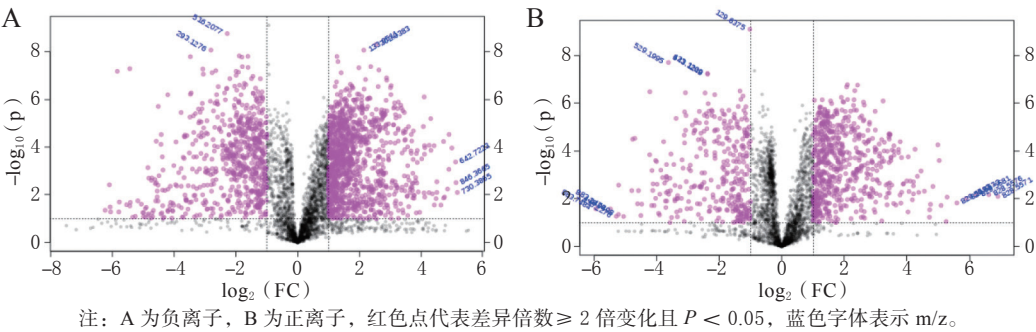
图 1 核桃内果皮不同发育期代谢物 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 结果

Fig.1 PCA, PLS-DA and OPLS-DA results of walnut endocarp metabolites in different development stage

2.2 核桃内果皮不同发育时期差异代谢物分析

通过 LC-MS 分析共鉴定出 7 837 个代谢物, 对其设定条件 ($|\log_2(FC)| \geq 1, P < 0.05$, FC 为 2 组数据差异倍数) 进行筛选后, 共得到 2 633 个差异代谢物, 其中负离子 1 714 个 (图 2A), 正离子 919 个

(图 2B), 将其比对至 HMDB 数据库后发现这些差异代谢物包括核苷酸及其衍生物、脂质、酚酸、氨基酸及其衍生物、生物碱、糖苷、有机酸、木脂素、黄酮类等。



注: A 为负离子, B 为正离子, 红色点代表差异倍数 ≥ 2 倍变化且 $P < 0.05$, 蓝色字体表示 m/z。

图 2 核桃内果皮不同发育期代谢物火山图

Fig.2 Volcanic map of metabolites in different developmental stages of walnut endocarp

2.3 核桃内果皮不同发育时期差异代谢物通路分析

将差异代谢物比对至 KEGG 数据库, 共富集至 35 个代谢通路 (图 3), 其中 26 个通路显著富集 ($VIP > 0.01$, 图 4), 共富集到 655 个差异代谢物质。对显著富集的代谢通路按照 p 值进行排序, 排在前几位的包括玉米素生物合成 (21 个差异代谢物)、组氨酸代谢 (15 个差异代谢物)、核黄素代谢 (11 个差异代谢物)、硫胺素代谢 (22 个差异代谢物)、苯丙氨酸和酪氨酸及色氨酸生物合成 (22 个差异代谢物)、嘧啶代谢 (38 个差异代谢物)、叶酸生物合成 (27 个差异代谢物) 等。在这些通路中, 以硫代葡萄糖苷生物合成 (65)、嘌呤代谢 (63)、吡啶和叶绿素代谢 (48) 和苯丙烷类生物合成 (46) 通路富集到的差异代谢物最多。

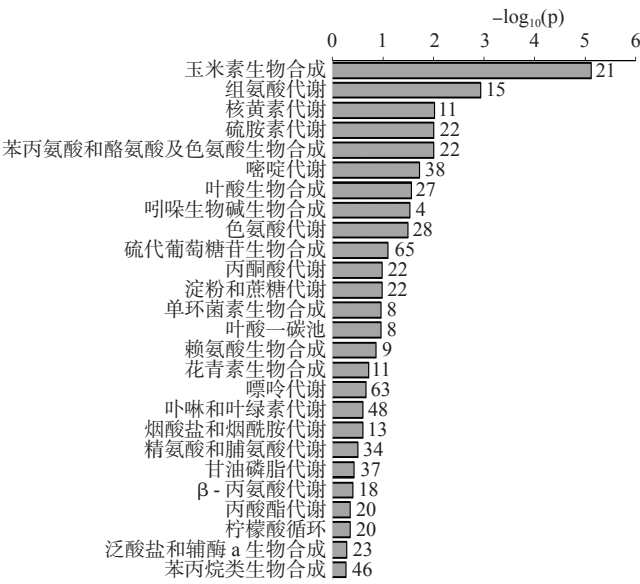


图 4 26 个显著富集代谢通路信息

Fig.4 The information of 26 significantly enriched metabolic pathways

进一步提高筛选条件 ($|\log_2(FC)| \geq 2, P < 0.05$), 将得到的差异代谢物绘制热图并进行聚类分析 (基于 Pearson 方差相关的层次聚类, 图 5) 发现, 花后 20 和 45 d 的内果皮代谢方式具有显著差异。花后 45 d 时, 大部分的差异代谢物的含量较花后 20 d 时降低, 包括核苷酸、有机酸、生物碱、萜类、脂质等大类。含量升高的差异代谢物包括糖苷、氨基酸及其衍生物、类黄酮、酚酸等大类。按照差异倍数由大到小分别筛选出上调与下调差异代谢物各 10 个, 并分类标注, 结果如图 6, 共分为 6 大类,

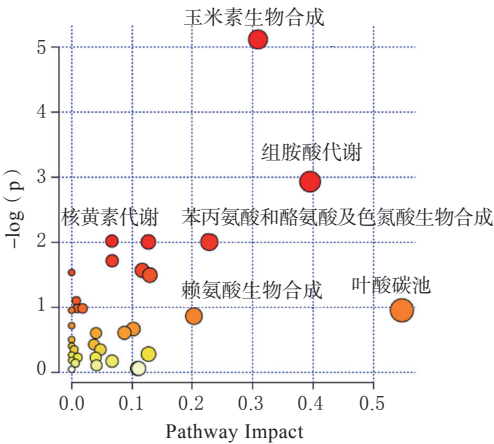


图 3 通过 KEGG 通路分析计算的通路影响因素

Fig.3 Impact factors of pathways calculated by KEGG pathway analysis

包括有机酸、糖苷、生物碱、类黄酮、核苷酸和其它类，均为次生代谢产物。生物碱和糖苷类化合物是主要的代谢物，分别含有 7 个和 6 个成员。有机酸、

有机色素、大部分糖苷和部分生物碱均呈上调变化，全部核苷酸、黄酮类、小部分糖苷和生物碱呈下调变化。

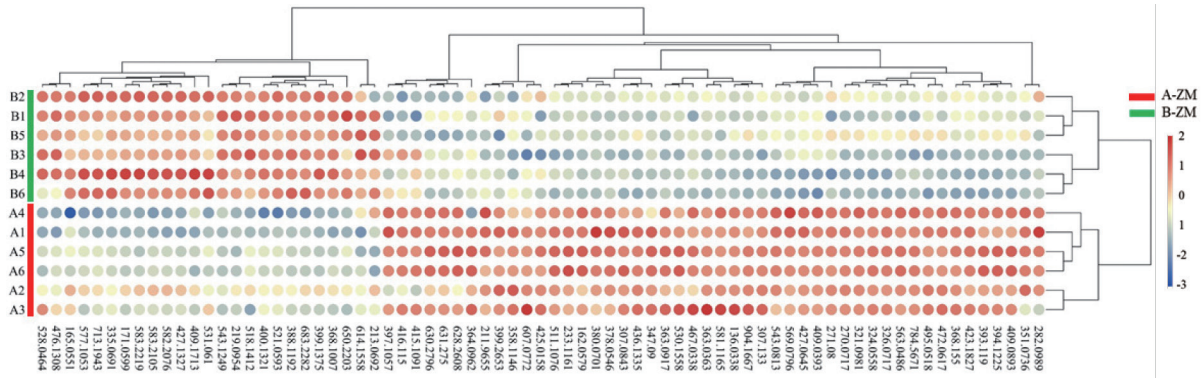
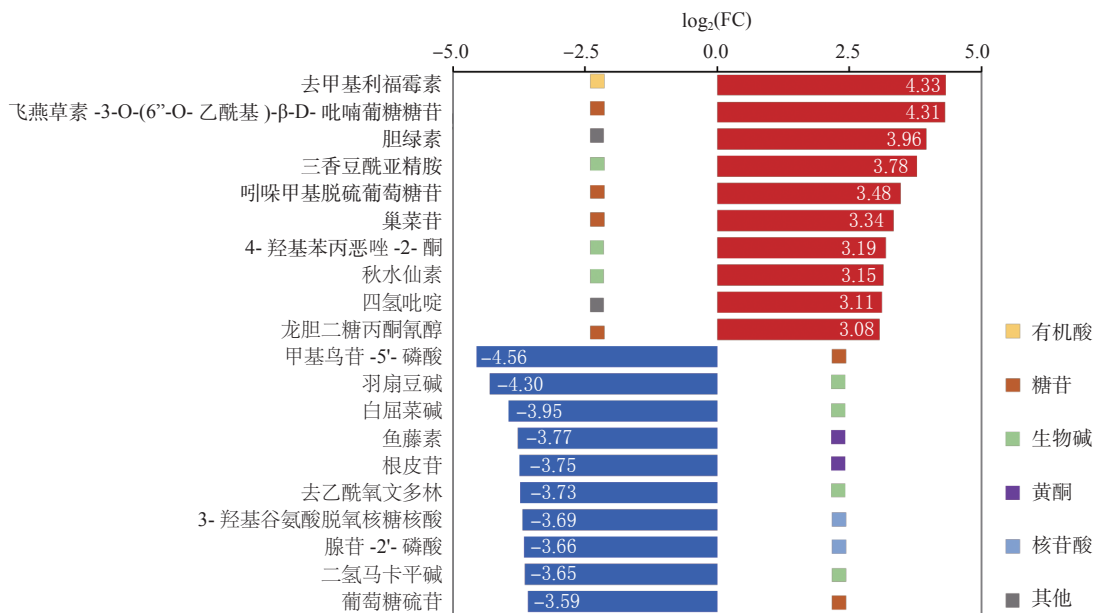


图 5 差异代谢物热图

Fig.5 Heatmap of differential metabolites



红色条形图代表上调变化的差异代谢物，蓝色条形图代表下调变化的差异代谢物。

图 6 上调与下调各前 10 位差异代谢物

Fig.6 Top 10 up- and downregulated differential metabolites

2.4 不同发育时期核桃内果皮差异代谢物与转录组联合分析

转录组和代谢组的联合分析用于确定基因和代谢物之间的相关性。基于部分先前研究基础^[18]，结合代谢组信息，对所有差异基因和差异代谢物的代谢通路富集情况进行了分析，以显示差异基因和

差异代谢物的共富集途径。如图 7 所示，二者均包含 22 个相同代谢通路，如玉米素生物合成、色氨酸代谢、淀粉和糖代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙烷类生物合成和单环菌素生物合成等通路。

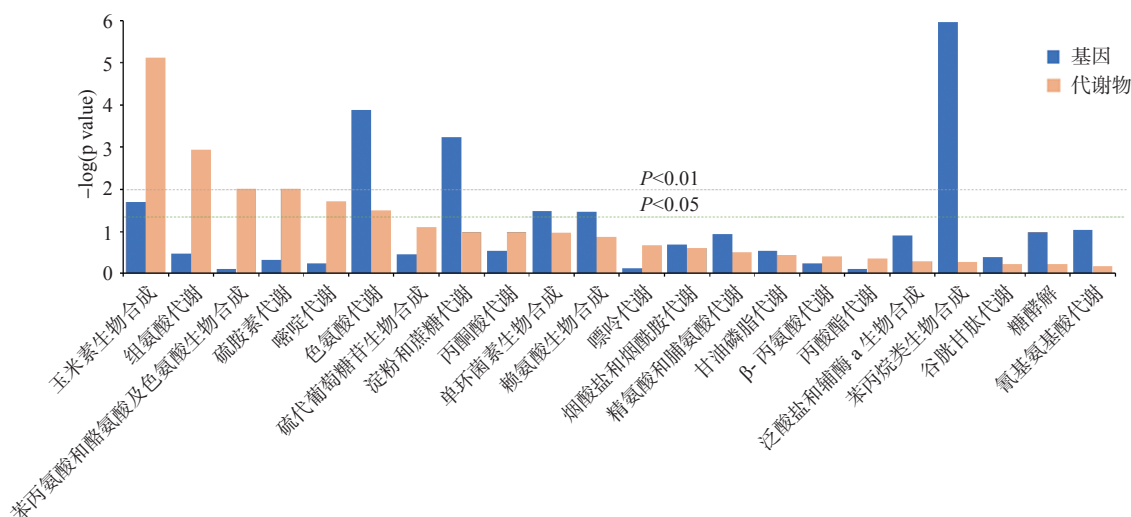
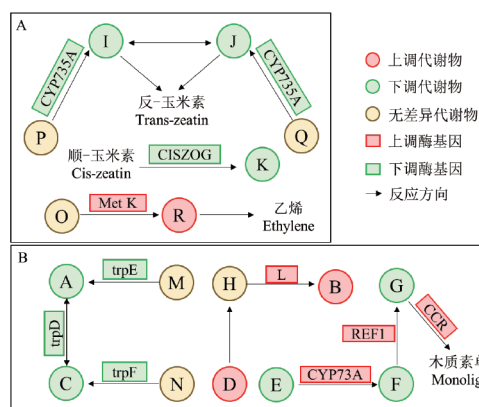


图 7 代谢组与转录组共同富集通路

Fig.7 Pathways enriched in both metabolite and RNA-seq

对激素相关通路和苯丙烷类生物合成途径筛选出的差异基因和代谢产物进行分析, 进一步了解差异基因与相应的激素及木质素单体形成相关化合物之间的调控关系。如图 8A 所示, 2 种异戊烯基腺苷受 2 个细胞色素 450 基因 (*CYP735A*) 正调控合成反式玉米素前体反 - 玉米素磷酸; 顺 - 玉米素受糖苷转移酶正调控合成玉米素糖苷; L- 甲硫氨酸经 S- 腺苷甲硫氨酸合成酶催化合成 S- 腺苷甲硫氨酸, 最终合成乙烯。花后 45 d 时, 2 个细胞色素 450 基因和顺 - 玉米素 - 氧 - 糖苷转移酶基因表达量均降低, 反 - 玉米素磷酸和顺 - 玉米素 - O- 糖苷含量均下调; S- 腺苷甲硫氨酸合成酶基因表达量上调, 其下游代谢物 S- 腺苷 - L- 甲硫氨酸含量升高。苯丙烷类生物合成相关调控网络 (如图 8B) 中, 分支酸和 1-(2- 羰基苯胺)-1- 去氧 -D- 核酮糖 -5- 磷酸酯分别在邻氨基苯甲酸合成酶和磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶基因的调控下合成邻氨基苯甲酸和 N-(5- 磷酸核糖)- 邻氨基苯甲酸, 二者又在邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶基因的调控下互相变化, 3 个酶基因与 2 个代谢产物在花后 45 d 均呈下调趋势; 顺 - β -D- 糖苷 -2- 羟基肉桂酸甲酯受 β -D- 葡萄糖苷酶基因正调控合成香豆素, 调控基因和香豆素均上调; 肉桂酰 - 辅酶 A、阿魏酰 - 辅酶 A、6'- 羟基阿魏酰 - 辅酶 A 分别受到正调控的细胞色素酶、松柏醛脱氢酶和肉桂酰辅酶 A 还原酶基因调控, 在花后 45 d, 基因表达量上调, 木质素单体大量形成, 作为原料的 3 个代谢物含量均下调。



A: 邻氨基苯甲酸 B: 香豆素 C:N-(5- 磷酸核糖)- 邻氨基苯甲酸 D: 反 - β -D- 糖苷 -2- 羟基肉桂酸甲酯 (E): 肉桂酰 - 辅酶 A F: 阿魏酰 - 辅酶 A G: 6'- 羟基阿魏酰 - 辅酶 A H: 顺 - β -D- 糖苷 -2- 羟基肉桂酸甲酯 I: 反 - 玉米素核苷二磷酸 J: 反 - 玉米素核苷单磷酸 K: 顺 - 玉米素 - O- 糖苷 L: β -D- 葡萄糖苷酶 M: 分支酸 N: 1-(2- 羰基苯胺)-1- 去氧 -D- 核酮糖 -5- 磷酸酯 O: L- 甲硫氨酸 P: 异戊烯基 - 二磷酸腺苷 Q: 异戊烯基 - 磷酸腺苷 R: S- 腺苷 - L- 甲硫氨酸 CISOZG: 顺 - 玉米素 - 氧 - 糖苷转移酶 met K: S- 腺苷甲硫氨酸合成酶 trp D: 邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶 trp E: 邻氨基苯甲酸合成酶 trp F: 磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶 REF1: 松柏醛脱氢酶 CCR: 肉桂酰辅酶 A 还原酶

图 A 为激素相关通路; 图 B 为木质素合成相关通路。

图 8 所选基因和代谢物调控网络

Fig.8 Regulating network between the selected genes and metabolites

3 讨论与结论

植物代谢组学已成为近年来广泛使用的方法, 随着人类对化合物认识的增长以及分析工具的进步, 植物中代谢物的数量不断增长^[19]。代谢物质的变化与果实发育进程紧密相关^[14], 本试验利用代谢组学技术, 以花后 20 和 45 d 的核桃内果皮为材料, 分析二者的代谢物质差异, 结果表明组内样本具有良好的重

复性,组间代谢物具有明显差异。花后20 d时,‘赞美’核桃果实处于快速增大阶段,内果皮细胞快速分裂与增大,此时其内果皮不断增厚但无木质素积累,细胞中主要以初生代谢为主,产生多种初级代谢产物,次生代谢反应此时较弱,大量反应底物因未被消耗而积累,促进型激素(生长素、赤霉素、细胞分裂素)含量较高,与鱼尚奇^[20]对‘新露’核桃内果皮的激素研究结果一致。至花后45 d,内果皮进入木质素快速形成期,整个内果皮外侧与缝合线交界处均有木质素积累,此后内果皮中木质素快速合成与积累^[18],此时初生代谢活动减弱,次生代谢旺盛,作为次生代谢底物的有机酸、生物碱、萜类、脂质等物质被大量消耗合成新的代谢产物,包括酚酸、类黄酮、木质素单体等,同时细胞分裂素水平降低。花后45 d时,大部分的差异代谢物的含量较花后20 d时降低,与徐徐^[21]对山核桃不同发育时期代谢物分析的结果一致。两时期具有显著差异的代谢物中次生代谢物占比较高,上调与下调前10的差异物全部为次生代谢产物,说明次生代谢活动旺盛。

对不同发育时期核桃内果皮差异代谢物与基因转录水平联合分析发现二者富集到了22个相同的代谢通路,但由于植物相关的代谢通路数据库多以拟南芥为背景,因此转录组与代谢组中各自仍有部分通路未被富集,同时被富集到的通路中代谢物与基因表达之间也会存在不能完全一一对应的情况,但随着化合物谱库的不断完善,化合物的识别逐渐趋于精准^[19],调控网络也会更加完善。通过对富集到的共同代谢通路和内果皮发育状态进行分析,本研究关注了激素相关通路和木质素生物合成相关通路,并对差异代谢物和差异基因表达进行分析,发现差异代谢物变化情况与基因表达情况一致。花后45 d时玉米素含量降低,乙烯前体含量升高,多种酚酸及其木质素单体的前体因木质素单体的大量合成而降低,与张睿对铁核桃青皮和种仁中酚酸含量的测定结果一致^[22]。代谢组数据显示,发育初期的核桃内果皮中含有一些抗菌成分(如酮康唑等)、抗肿瘤成分(如文多林等),后期含有多种生物碱和类黄酮等次生代谢产物,具有重要的药用价值。

参考文献

- [1] 尹丹丹,李珊珊,吴倩,等.我国6种主要木本油料作物的研究进展[J].植物学报,2018,53(1):110-125.
- [2] Tapsell L C, Gillen L J, Patch C S, et al. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2004, 27: 2777-2783.
- [3] 赵悦平,赵书岗,王红霞,等.核桃坚果壳结构与核仁商品品质的关系[J].林业科学,2007(12):81-85.
- [4] 靳丽鑫,陈梦华,王玉莲,等.核桃坚果硬壳发育研究进展[J].北方园艺,2015(5):183-187.
- [5] 郑志锋,邹局春,花勃,等.核桃壳化学组分的研究[J].西南林学院学报,2006(2):33-36.
- [6] 苑雅萍,赵洪云,秦香芹,等.山核桃壳化学成分的研究[J].黑龙江医药,2006,19(1):33-34.
- [7] 郝慧娟.核桃壳提取物的成分分析及其抗氧化活性研究[D].晋中:山西农业大学,2013.
- [8] 刘丽金.核桃酚酸类成分抗氧化活性的初步研究[D].大理:大理大学,2018.
- [9] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11):1157-1161.
- [10] Raza A. Metabolomics: a systems biology approach for enhancing heat stress tolerance in plants [J]. Plant Cell Reports, 2020, 1-23.
- [11] Zhu X, Yang F, Lu J, et al. Plasma metabolomic profiling of proliferative diabetic retinopathy [J]. Nutrition & Metabolism, 2019, 16(1):37-48.
- [12] Li P, Zhao R, Zhao X, et al. Integrated transcriptome and metabolome analysis revealed that flavonoid biosynthesis may dominate the resistance of *Zanthoxylum bungeanum* against stem canker [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(22):6360-6378.
- [14] Silva E, Porto C, RMD Prado, et al. Untargeted metabolomics analysis by UHPLC-MS/MS of soybean plant in a compatible response to *Phakopsora pachyrhizi* infection [J]. Metabolites, 2021, 11(3):179-194.
- [15] Alseekh S, Fernie A. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? [J]. Plant Journal, 2018, 94(6):933-942.
- [16] 时羽杰,邬晓勇,糜加轩,等.核桃内种皮苦涩味品质代谢组学分析[J/OL].西北农林科技大学学报:自然科学版,2021(6):2-12.
- [17] 陆胜波.铁核桃果实青皮和内种皮芦丁合成的转录组与代谢组分析[D].贵阳:贵州大学,2020.
- [18] Zhu X R, Yang F Y, Lu J, et al. Plasma metabolomic profiling of proliferative diabetic retinopathy [J]. Nutrition & Metabolism, 2019, 16(1):37-48.
- [19] Wu X, Zhang Z, Sun M, et al. Comparative transcriptome profiling provides insights into endocarp lignification of walnut (*Juglans Regia* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 282:110030.
- [20] Last, Robert, L, et al. Towards the plant metabolome and beyond. [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8:167-174.
- [21] 鱼尚奇,张锐,郭众仲,等.核桃内果皮硬化期生长素动态变化及差异表达基因分析[J].园艺学报,2021,48(3):487-504.
- [22] 徐徐.山核桃果实发育过程类黄酮合成及代谢分析[D].杭州:浙江农林大学,2021.
- [23] 张睿.铁核桃果实发育过程中酚类代谢的转录组分析[D].贵阳:贵州大学,2019.

(责任编辑:王雅娇)