

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202104053

霍冬敖, 田瑞丰, 任永权, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术的野生及栽培韭菜籽的代谢组学研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(12): 1995–2006.

HUO DA, TIAN RF, REN YQ, et al. UPLC-MS/MS-based metabolomic characterization and contrastive analysis between *Allium wallichii* and *A. tuberosum* seeds [J]. *Guihaia*, 2022, 42(12): 1995–2006.



基于 UPLC-MS/MS 技术的野生及栽培韭菜籽的代谢组学研究

霍冬敖¹, 田瑞丰², 任永权³, 段星宇², 洪登峰², 汪波^{2*}

(1. 贵州师范大学求是学院, 贵阳 550000; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 3. 贵州民族大学生态环境工程学院, 贵阳 550000)

摘要: 多星韭为贵州省赫章县喀斯特地貌区重要的野生植物资源之一, 具有较高的开发利用价值。为分析野生多星韭(*Allium wallichii*) 籽与栽培韭菜(*A. tuberosum*) 籽代谢产物差异及其通路, 该研究利用 UPLC-MS/MS 物质分离鉴定技术, 对 2 种韭籽化学成分进行广泛靶向代谢组学分析。结果表明: (1) 共检测到 782 种代谢产物。(2) 主成分分析(PCA) 显示样本间存在差异, 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA) 共筛选出 12 类显著变化($P < 0.05$, $VIP \geq 1$) 的差异代谢物, 涉及 492 种, 其中上调和下调幅度在前 20 的代谢物包括黄酮、甾体皂苷、黄酮醇、酚酸类、异黄酮、游离脂肪酸、三萜皂苷、生物碱、吡啶类生物碱、氨基酸及其衍生物等。(3) KEGG 注释到 84 条差异代谢通路, 其中差异代谢物显著富集($P < 0.01$) 通路 4 条, 此外还构建了未注释到的显著差异代谢物甾体皂苷的生物合成通路。该研究结果为韭籽有效成分代谢途径解析及药理活性物质研究提供了参考, 也为赫章县野生多星韭的开发保护与多元化利用提供了新思路。

关键词: 多星韭, 代谢组, UPLC-MS/MS, 代谢通路, 甾体皂苷

中图分类号: Q945.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)12-1995-12

UPLC-MS/MS-based metabolomic characterization and contrastive analysis between *Allium wallichii* and *A. tuberosum* seeds

HUO Dongao¹, TIAN Ruifeng², REN Yongquan³, DUAN Xingyu², HONG Dengfeng², WANG Bo^{2*}

(1. Qishi College of Guizhou Normal University, Guiyang 550000, China; 2. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. College of Eco-Environmental Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550000, China)

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金(31960415); 中国民主同盟帮扶贵州省毕节市赫章县韭菜坪景区品质提升项目(20183952c01); 贵州省高等学校教学内容和课程体系改革项目(2019202) [Supported by National Natural Science Foundation of China(31960415); China Democratic League Assisted the Quality Improvement Project of Jiucaiping Scenic Area, Hezhang County, Bijie City, Guizhou Province(20183952c01); Guizhou Province Higher Education Teaching Content and Curriculum System Reform Project(2019202)].

第一作者: 霍冬敖(1989-), 博士, 副教授, 研究方向为民族植物开发利用, (E-mail) dongaohuo@gznu.edu.cn。

通信作者: 汪波, 博士, 副教授, 研究方向为民族植物开发利用, (E-mail) wangbo@mail.hzau.edu.cn。

Abstract: *Allium wallichii* is one of the important wild plant resources in the karst geomorphic area of Hezhang County, Guizhou Province, which has high development and utilization values. In order to analyze the differences of metabolites and their pathways between wild *Allium wallichii* seeds and cultivated *A. tuberosum* seeds, we used UPLC-MS/MS material separation and identification techniques to broadly target the chemical components of the two kinds of seeds for the metabolomic analysis. The results were as follows: (1) A total of 782 kinds of metabolites were detected. (2) Principal component analysis (PCA) showed that there were differences between samples. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) screened out 12 types of differential metabolites with significant changes ($P < 0.05$, $VIP \geq 1$), involving 492 kinds, among them, the top 20 metabolites with up-and down-regulation included flavonoids, steroidal saponins, flavonols, phenolic acids, isoflavones, free fatty acids, triterpenoid saponins, alkaloids, indole alkaloids, amino acids and their derivatives and soon. (3) KEGG annotated 84 differential metabolic pathways, of which four pathways were significantly enriched with differential metabolites ($P < 0.01$). In addition, the biosynthetic pathway of steroidal saponins, which were not annotated significantly differential metabolites, was constructed. This research result provides a reference for the analysis of the effective components of the two kinds of seeds and the study of pharmacologically active substances, and also provides new ideas for the development, protection and diversified utilization of wild *A. wallichii* in Hezhang County.

Key words: *Allium wallichii*, metabolome, UPLC-MS/MS, metabolic pathway, steroidal saponins

多星韭 (*Allium wallichii*) 是一种多年生草本植物, 属百合科 (Liliaceae) 葱属 (*Allium* L.) 粗根组 (Sect. *Bromatorrhiza*), 主要分布于我国云南、贵州、四川西南部、西藏东南部、广西北部 and 湖南南部等西南地区 (中国科学院中国植物志委员会, 1980)。“贵州屋脊”毕节市赫章县韭菜坪是世界最大面积的天然野韭菜花带, 多星韭为该植物保护区的绝对优势物种 (丁卫红等, 2007; 唐汉青等, 2020)。葱属植物含有丰富的营养物质和多种生物活性成分, 具有广泛的生理和药理功能 (刘建涛等, 2007; 司民真等, 2014)。韭菜是我国重要的葱属蔬菜, 在人们日常膳食中起重要作用 (郭凤领等, 2013)。韭菜叶和薹中含有碳水化合物、蛋白质、脂肪、纤维素、维生素 C 和多种微量元素, 用途广泛, 具有保健和食疗的功效 (蹇黎和朱利泉, 2009)。韭菜籽中含有生物碱、核苷、甾体皂苷、黄酮、挥发油、不饱和脂肪酸等活性成分, 具有抗血小板聚集、抗肿瘤和抗真菌的功能 (邹忠梅等, 1999; 张新茹等, 2009; 李欢等, 2017)。多星韭叶和薹中氨基酸、微量元素、维生素 C 等营养物质的含量均高于普通韭菜 (王海平等, 2017)。野韭菜是韭菜品质遗传改良的宝贵资源, 赫章县多星韭种质资源丰富, 多星韭籽产量高, 但由于自然发芽率低等因素, 因此野生种质未得到很好的利用 (朱宽香等, 2017)。近年来, 对多星韭的研究大多在染色体核型鉴定、营养成分分析和生物活性物质

提取与应用等方面。然而, 基于代谢组学对韭菜籽代谢物和代谢物途径研究还鲜有报道 (邹晓菊, 2013; 孙婕等, 2014; 刘盼盼等, 2015)。

代谢组学分析是一种基于高通量化学检测整个生物体内小分子代谢物数据的研究方法, 从生物体中检测和筛选差异显著的代谢物, 并在此基础上研究相应的代谢过程和变化机制 (Nicholson et al., 1999)。目前, 已广泛应用于生物学、医学、药学、农学、食品等科学领域 (Sumner et al., 2015)。常被用于植物应激反应机制研究、疾病诊断和药物鉴定、植物不同部位代谢差异、食物营养成分和品质鉴定等 (Fatma et al., 2007; Brennan et al., 2013; Rao et al., 2017; Casas-FERREIRA et al., 2019)。李乐乐 (2020) 利用 HILIC-LC-MS 技术对人参和西洋参化学成分进行鉴定, 在人参皂苷、寡糖和氨基酸三种成分中找到了区分人参和西洋参的标志物。黄晓荣 (2017) 采用 LC-MS 技术对黑花生和栽培花生种子进行代谢组学研究, 发现黑花生与其栽培品种的营养成分存在差异, 并找到黑花生的优势营养成分。姚诗琪等 (2020) 通过 GC-MS 的代谢组学方法发现掌叶草中的三萜皂苷能有效抑制肝癌肿瘤生长。代谢组学为分析不同植物品种间代谢产物的差异, 特别是为药用植物的有效成分及代谢通路研究提供了方法。

本研究基于超高效液相色谱和串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的代谢组学方法, 检测多星韭籽

和韭菜籽 2 种材料的代谢组分, 筛选其中差异显著的生物活性物质并分析相关的代谢途径, 以期为韭菜的遗传改良提供指导, 为多星韭籽食用、药用等功能产品的开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

本研究材料为 2020 年 9 月在全国唯一的野生韭菜花保护区, 即在贵州省毕节市赫章县韭菜坪

(103°36′—104°45′ E, 26°19′—27°27.28′ N) 采集的多星韭籽。该地区处于我国西南喀斯特连片分布区, 海拔约 2 700 m, 气候温暖, 太阳辐射量高, 气温日差较大、年差较小。多星韭籽为秋季果实成熟后采收果序晒干搓出种子除去杂质得到, 形状近似三角盾形, 种皮坚硬且腹背有细细的皱纹, 千粒重为 3.754 g (图 1:A)。韭菜籽为平顶山农科院选育的‘平韭 6 号’, 形状呈扁卵形或半卵形, 表面粗糙且有细密网状皱纹, 千粒重为 4.776 g (图 1:B)。

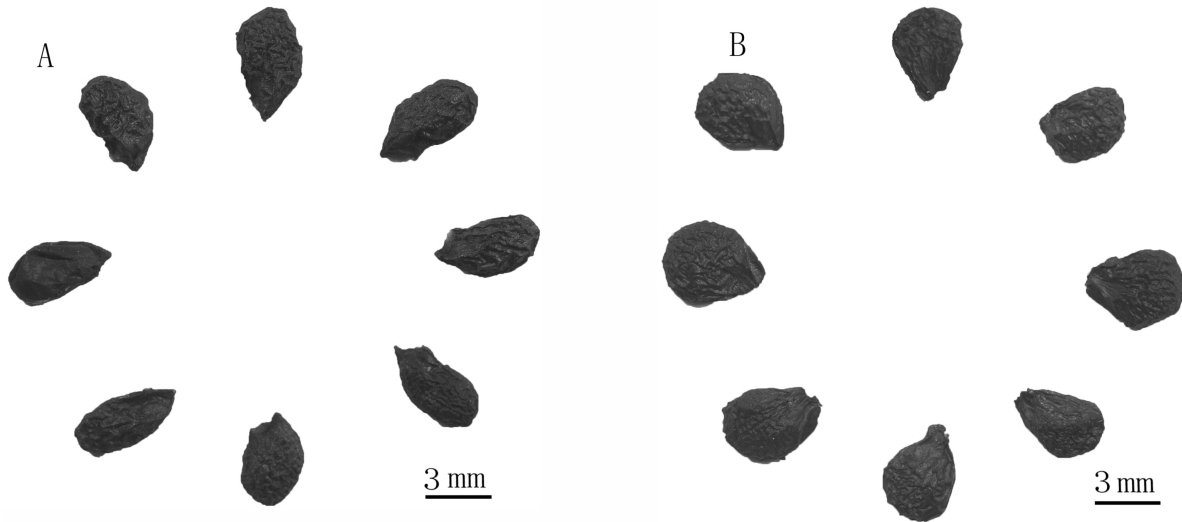


图 1 多星韭籽 (A) 与韭菜籽 (B) 形态

Fig. 1 Morphology of *Allium wallichii* seeds (A) and *A. tuberosum* seeds (B)

1.2 方法

1.2.1 试验方法 多星韭籽与韭菜籽 2 种样品各设 3 个生物学重复, 将 6 个样品放置于冻干机中, 在真空条件下冷冻干燥后使用研磨仪使其成粉末状。称取 100 mg 韭籽粉末溶于甲醇提取液中, 在涡旋锅中涡旋 6 次后置于 4 °C 冰箱过夜。次日经离心后吸取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后保存滤液于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。用超高效液相色谱和串联质谱数据采集系统进行代谢物分离鉴定。

1.2.2 色谱条件 色谱柱选择 Agilent SB-C18 (10 cm × 2.1 mm); 流动相 A 相为加入 0.1% 甲酸的超纯水, B 相为加入 0.1% 甲酸的乙腈; 洗脱梯度 0.00 min 时 B 相比例设为 5%, 9.00 min 内上升至 95%, 并在 95% 保持 1 min, 10.00 ~ 11.10 min 时 B 相减少至 5%, 并保持 5% 平衡至 14 min; 柱温为 40 °C;

进样量为 4 μL; 流速为 0.35 mL · min⁻¹。

1.2.3 质谱条件 LIT 和三重四极杆 (QQQ) 扫描是在三重四极杆线性离子阱质谱仪 (QTRAP), UPLC-MS/MS 系统上获得的, 该系统配备了 ESI Turbo 离子喷雾接口, 可由 Analyst 1.6.3 软件控制正负 2 种离子模式运行。ESI 源操作参数如下: 离子源, 涡轮喷雾; 源温度 550 °C; 离子喷雾电压 (IS) 5 500 V (正离子模式)/-4 500 V (负离子模式); 离子源气体 I (GS I), 气体 II (GS II) 和帘气 (CUR) 分别为 50、60、25.0 psi, 碰撞诱导电离参数为高。在 QQQ 和 LIT 模式下, 分别用 10、100 μmol · L⁻¹ 聚乙二醇溶液进行仪器调谐与质量校准。QQQ 扫描使用 MRM 模式, 并将碰撞气体 (氮气) 设置为中等。通过进一步的 DP 和 CE 优化, 完成各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物, 在每个时期监测 1 组特定的 MRM 离子对。

1.2.4 质控样本 质控(quality control, QC)样本通过等量混合多星韭籽和韭菜籽制备而成质控样本(mix),与分析样本采用相同的色谱和质谱检测分析方法,共设置3个生物学重复。同时,为监测分析过程中的样本重复性,在每10个分析样本中随机插入1个质控样本,共插入3个,共计9个样本。

1.3 数据处理

利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据,基于武汉迈特维尔生物科技公司自建数据库 MVDB 及代谢信息公共数据库,根据二级谱信息进行代谢物定性,以 MultiaQuant 软件进行质谱峰的积分校正。利用 R 语言中的内置统计 prcomp 函数对数据进行归一化(unit variance scaling, UV)处理,并对2组样品进行主成分(PCA)分析,PCA用R语言软件(base package)(版本3.5.0)(www.r-project.org)的内置统计 prcomp 函数,设置 prcomp 函数参数 scale=True,表示对数据进行 UV 归一化。利用 R 语言中的内置 cor 函数计算皮尔逊相关系数 r 来检测重复样品相关性。利用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)将原始数据进行 \log_2 转换后进行中心化处理,公式为 $x^* = x - \bar{x}$;使用 R 语言中的 Metabo AnalystR 包(版本1.0.1) OPLSR. Anal 函数进行数据分析得到变量重要性投影值(VIP),为避免过拟合,对其进行200次排列测试以验证模型准确性。用 UV 将差异代谢物含量数据归一化处理后通过 R 语言中的 pheatmap 包(版本1.0.12)绘制热图,用聚类分析(HCA)分析不同样品间代谢物积累规律。将得到的差异代谢物映射到 KEGG PATHWAY 数据库中(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>),进行相关通路分析,并通过超几何检验的 P 值确定其显著性。

2 结果与分析

2.1 样本质控分析

PCA 是一种能在最大限度保存原始数据信息的前提下,通过建立数学模型把高维复杂数据进行简化降维来总结样本代谢谱特征的统计方法。由图 2:A 可知,各组间存在明显的分离趋势,说明每个样本的数据处理结果是可信的,每个样本之间存在明显差异。由图 2:B 可知,通过样本间的皮尔逊相关系数 r 观察到多星韭籽(Kunth)、韭菜籽(Rottl)和质控样本(mix)组内的 r 均大于 0.9,

说明组内的重复样本相关性极强、重复性好,可以用于后续差异代谢物分析。

OPLS-DA 可以去除主成分分析中无关的差异信息,从而筛选出差异代谢物。由图 3:A 可知,多星韭籽和韭菜籽在 PC1 主成分上有明显的分离,所建的 OPLS-DA 模型对 X 和 Y 矩阵的解释率分别为 $R^2X = 0.907$ 、 $R^2Y = 1$,对模型预测的 Q^2 值是 0.999,这3个指标的值都接近1,表示模型稳定可靠有效,能较好地预测结果。为了避免过拟合,我们使用 OPLS-DA 模型进行 200 次随机排列组合实验进行验证,当 Q^2 的 $P = 0.02$ 时,说明 4 种随机分组模型的预测能力都优于 OPLS-DA 模型,当 R^2Y 的 $P = 0.545$ 时,说明对 Y 矩阵的解释率有 109 个随机分组模型优于 OPLS-DA 模型。一般情况下, $P < 0.05$ 时模型最佳。由图 3:B 可知, Q^2 和 R^2Y 的 P 值均小于 0.005,表明模型可用且可根据 VIP 对差异代谢物进行筛选。

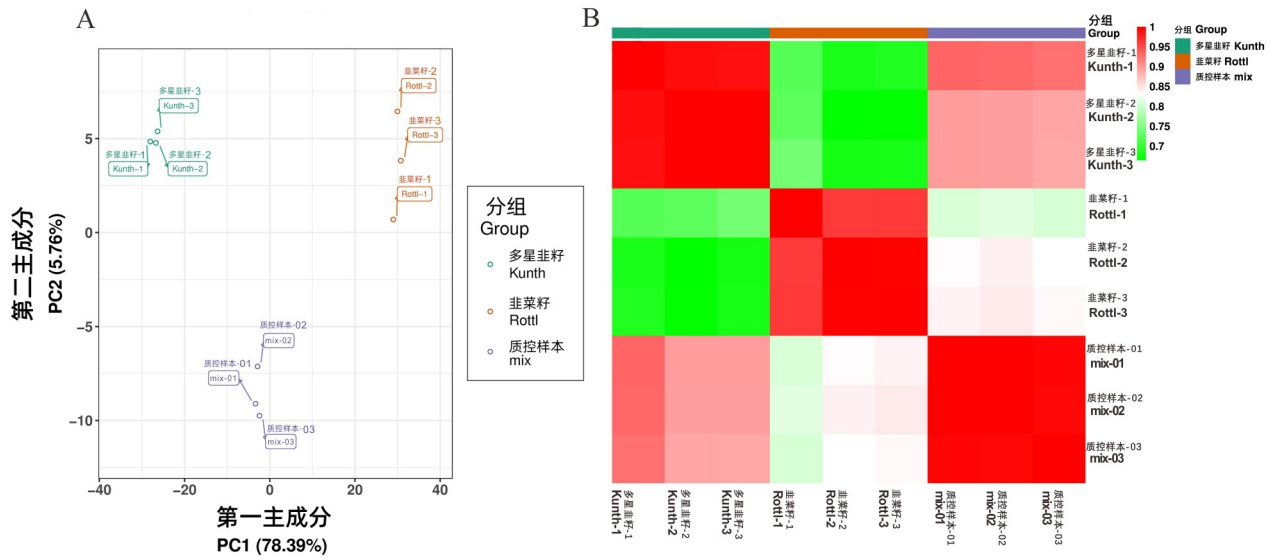
2.2 代谢物分析

根据 MRM 代谢物检测多峰图,分别从多星韭籽和韭菜籽中检测到 733 个和 634 个代谢物,结果见图 4。利用 MultiaQuant 软件进行色谱峰积分和校正,确保定性、定量分析的准确性。以 KEGG PATHWAY 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)为背景,检测到的 782 个代谢物中有 457 个通过 MB Role 网站的 ID 转换功能获得了 KEGG 输出 ID。

代谢物的聚类分析可用于简单直观地观察代谢物组成。从图 5 可以看出,2 种韭籽代谢产物的相对含量存在明显差异。在检测到的 782 种代谢产物中,有黄酮、脂类、酚酸、氨基酸及其衍生物、有机酸、核苷酸及其衍生物、生物碱、甾体、萜类、木脂素类和香豆素类、鞣质等。

2.3 差异代谢物筛选

基于 OPLS-DA 结果,多变量分析模型的 VIP 可以筛选出多星韭籽与韭菜籽之间差异的代谢物。由图 6:A 可知,靠近右上角和左下角的代谢物有显著差异,红色表示 $VIP \geq 1$ 的代谢物质。利用差异倍数(fold change, FC)可结合单变量统计分析来进一步筛选差异代谢物,以 2 组样品中差异为 2 倍以上或 0.5 以下认为是差异显著,即 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 。2 组差异代谢物的数量和变化可以从图 6:B 的火山图中清楚看到,从多星韭籽和韭菜籽中检测到的 782 种代谢物中筛选出 12 类 492



Kunth. 多星韭籽; **Rottl.** 韭菜籽; **mix.** 质控样本; 每组样品 3 个生物学重复。下同。

Kunth. *Allium wallichii* seeds; **Rottl.** *A. tuberosum* seeds; **mix.** Quality control sample; each group of samples has three biological replicates. The same below.

图 2 多星韭籽与韭菜籽的 PCA 得分 (A) 和相关性 (B)

Fig. 2 PCA scores (A) and correlation (B) of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

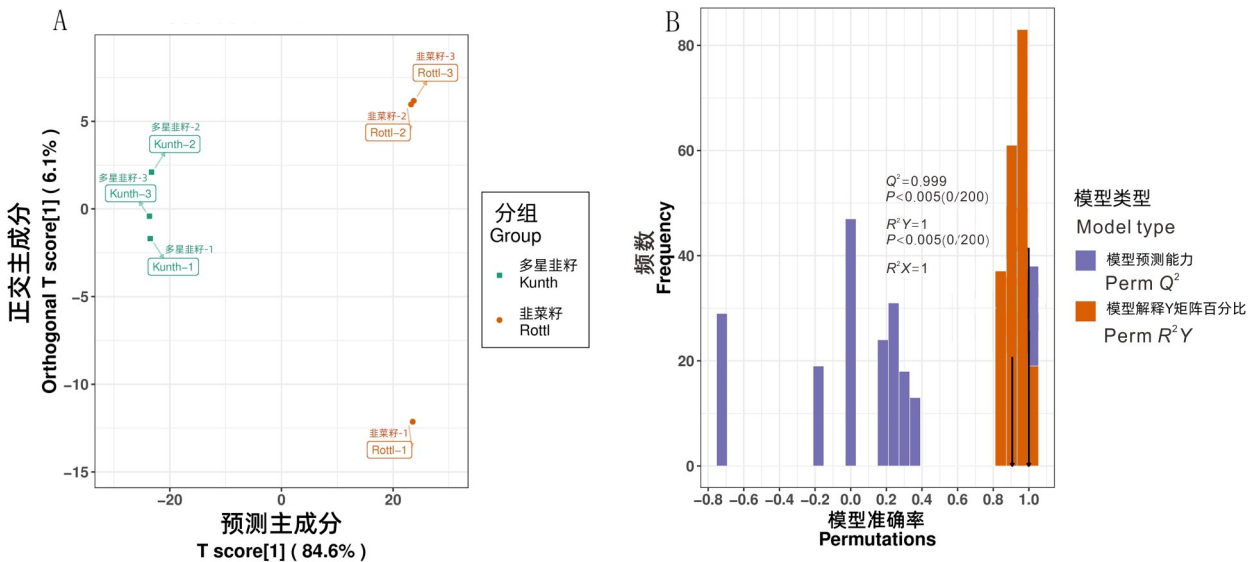
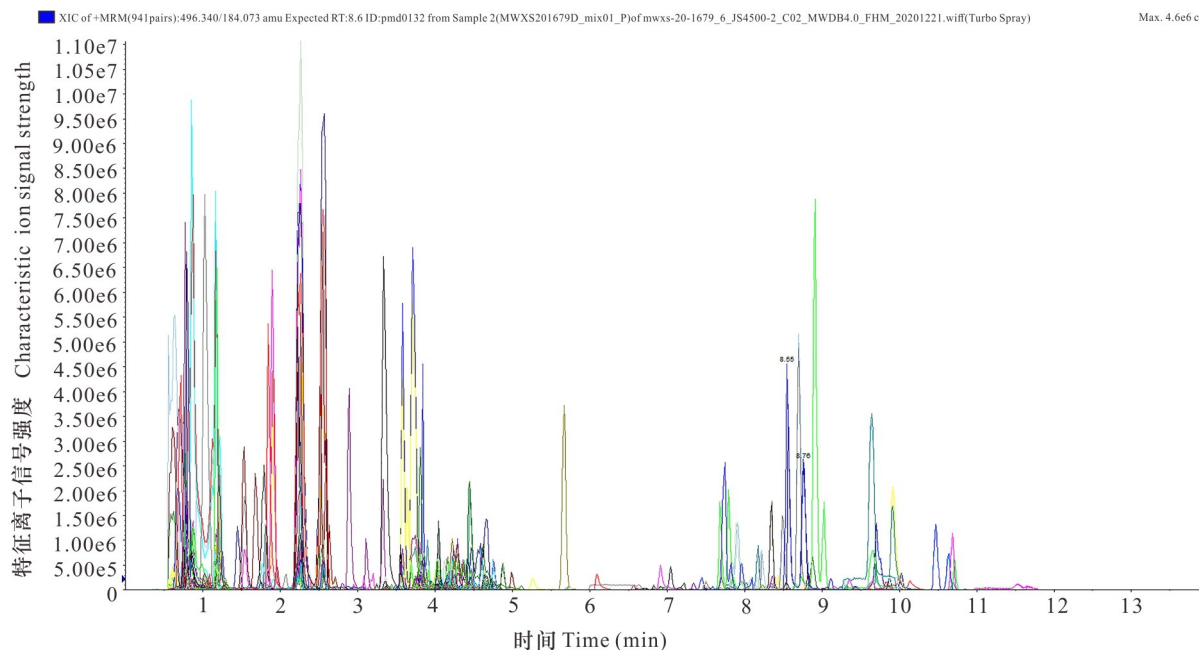


图 3 多星韭籽与韭菜籽的 OPLS-DA 得分图 (A) 和验证图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA scores (A) and verification (B) of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

种差异代谢物,其中多星韭籽中 114 种代谢物与韭菜籽相比上调,378 种下调。为了便于观察代谢物变化规律,对差异代谢物归一化处理并绘制热图,结果如图 5 所示。差异代谢物种类由多到少

分别是 107 种黄酮、71 种脂类、57 种酚酸、52 种氨基酸及其衍生物、41 种有机酸、30 种核苷酸及其衍生物、31 种生物碱、39 种其他类、34 种甾体、16 种萜类、11 种木脂素和香豆素类、3 种鞣质。对差



每个不同颜色的质谱峰代表一种检测到的代谢物。

Each mass spectrum peak with a different color represents a detected metabolite.

图 4 MRM 代谢物检测多峰图

Fig. 4 Multimodal graph of MRM metabolite detection

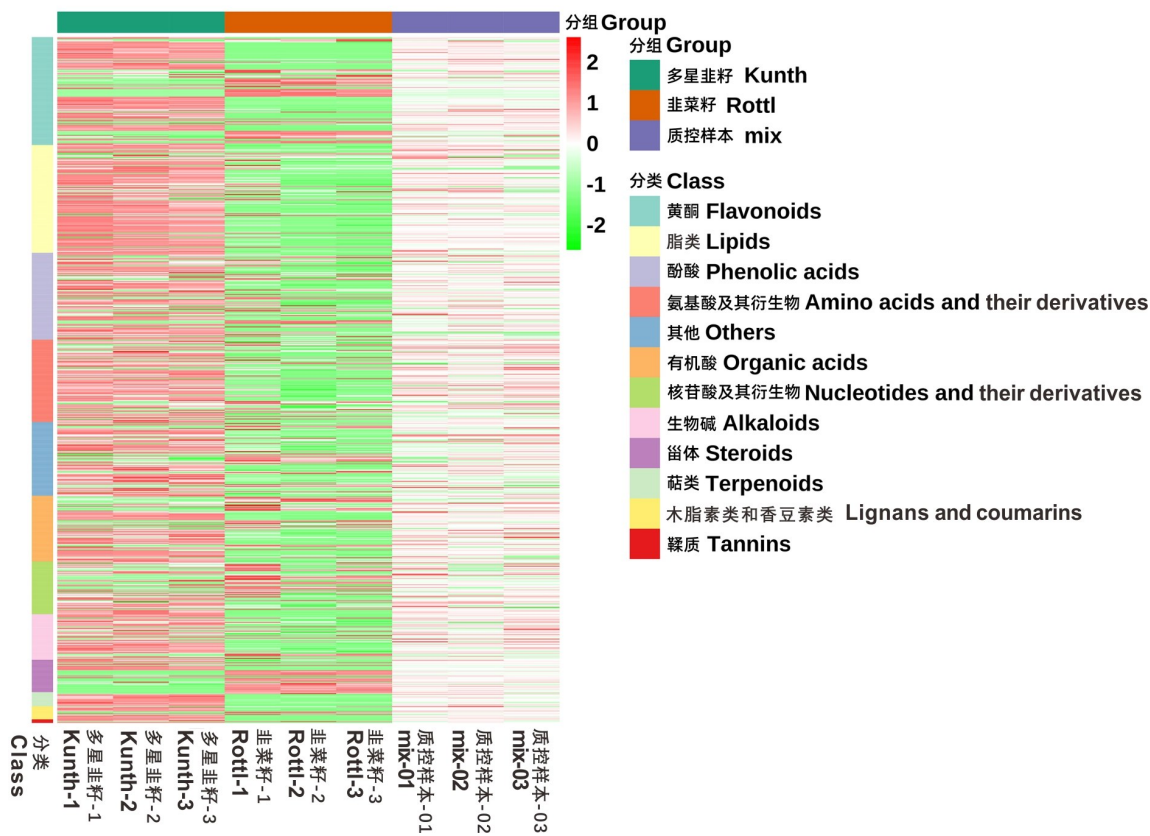


图 5 样本全部代谢物质分类聚类热图

Fig. 5 Classification and clustering heat map of all metabolites in all samples

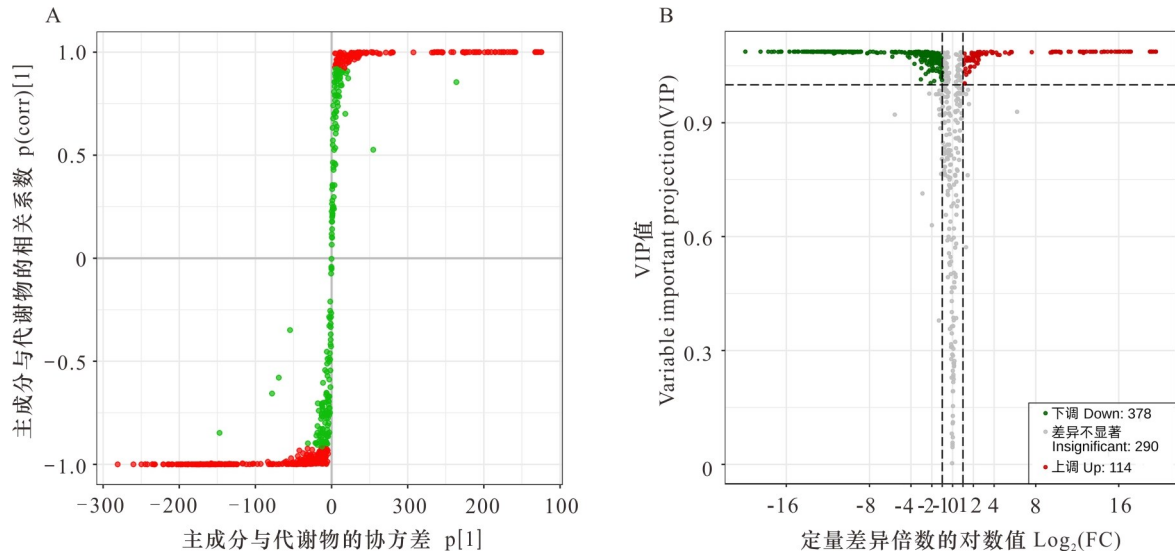


图 6 多星韭籽与韭菜籽的正交偏最小二乘法的 S-Plot 图 (A) 和差异代谢物火山图 (B)

Fig. 6 S-Plot (A) of OPLS-DA and volcano plot (B) of screening differential metabolites of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

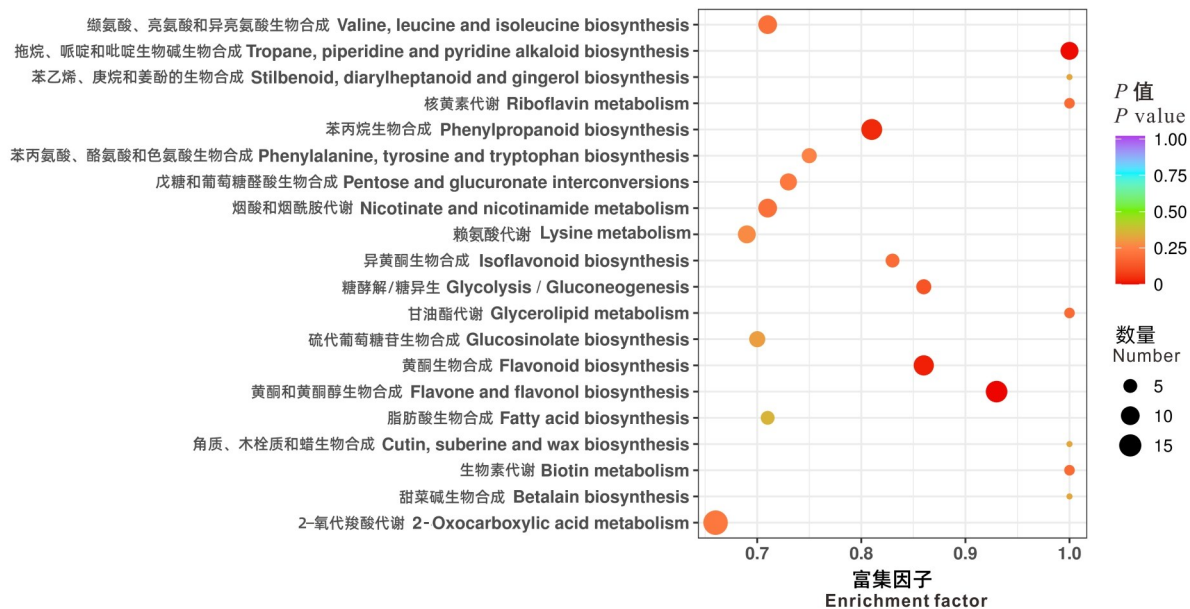


图 7 多星韭籽与韭菜籽的差异代谢物 KEGG 富集图

Fig. 7 KEGG enrichment map of differential metabolites of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

异代谢物的 $\log_2(FC)$ 值进行排序, 列出差异倍数最高(上调和下调)的代谢物, 结果如表 1 所示。多星韭籽与韭菜籽相比上调幅度前 20 的差异代谢物有 6 种黄酮、5 种甾体皂苷、3 种黄酮醇、2 种酚酸类、2 种异黄酮、1 种游离脂肪酸、1 种三萜皂苷, 其中上调差异倍数最大的代谢物是三萜皂苷

类的延龄草苷-6-O-槐三糖苷 (trillium-6-O-sophorotrioside) 在多星韭籽中约为韭菜籽中的 1.0×10^6 倍。下调幅度前 20 的差异代谢物中有 12 种甾体皂苷、4 种黄酮醇、1 种黄酮、1 种生物碱、1 种吡啶类生物碱、1 种氨基酸及其衍生物, 其中下调差异倍数最大的代谢物是甾体皂苷中的 tuberoside R,

表 1 多星韭籽与韭菜籽差异倍数前 20 的代谢物质
Table 1 Metabolites of the Top 20 fold changes of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

序号 No.	化合物 Compound	物质一级分类 Substance primary classification	物质二级分类 Substance secondary classification	差异倍数 Fold change	log ₂ (FC)	变化类型 Type of change
1	延龄草苷-6-O-槐三糖苷 Trillium-6-O-sophorotrioside	萜类 Terpenoids	三萜皂苷 Triterpene saponins	1 009 074.07	19.94	上调 Up
2	鲁斯可皂苷元-1-O-鼠李糖基(1,2)葡萄糖基(1,2)葡萄糖苷 Ruscopapogenin-1-O-rhamnosyl(1,2) glucosyl(1,2) glucoside	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	365 692.59	18.48	上调 Up
3	24-羟基偏诺皂苷元 24-Hydroxymetanopapogenin	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	218 711.11	17.74	上调 Up
4	偏诺皂苷元-3-O-葡萄糖苷 Pronosapogenin-3-O-glucoside	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	174 870.37	17.42	上调 Up
5	薯蓣皂苷元 Diosgenin	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	148 362.96	17.18	上调 Up
6	花生酸 (C20:0) Arachidic acid (C20:0)	脂质 Lipids	游离脂肪酸 Free fatty acid	112 314.07	16.78	上调 Up
7	6-C-甲基槲皮素-3-O-芸香糖苷 6-C-methylquercetin-3-O-rutinoidse	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	97 870.00	16.58	上调 Up
8	3,5,7,4-四羟基-8-甲氧基黄酮-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷 3,5,7,4-Tetrahydroxy-8-methoxyflavonoid-3-O-glucoside- 7-O-rhamnoside	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	94 420.74	16.53	上调 Up
9	柃柳黄素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷 Tamarixanthin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside	黄酮 Flavonoids	黄酮 Flavonoids	94 265.93	16.52	上调 Up
10	2-羟基-5-甲氧基染料木素-O-鼠李糖-葡萄糖 2-Hydroxy-5-methoxygenistein-O-rhamnose-glucose	黄酮 Flavonoids	异黄酮 Isoflavones	93 622.96	16.51	上调 Up
11	异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷 Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	萜类 Terpenoids	黄酮醇 Flavonols	91 008.52	16.47	上调 Up
12	偏诺皂苷元-3-O-鼠李糖基(1→4)鼠李糖基(1→2)葡萄糖苷 Pynosapogenin-3-O-rhamnosyl(1→4) rhamnosyl(1→2) glucoside	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	53 158.89	15.70	上调 Up
13	2-乙酰毛蕊花糖苷 2-Acetyl verbascoside	甾体 Steroids	酚酸类 Phenolic acids	53 092.22	15.70	上调 Up
14	3-O-甲基五羟黄酮-7-O-葡萄糖苷 3-O-methylquercetin-7-O-glucoside	甾体 Steroids	黄酮 Flavonoids	39 784.07	15.28	上调 Up
15	1-O-芥子酰-D-葡萄糖 1-O-sinoyl-D-glucose	甾体 Steroids	酚酸类 Phenolic acids	37 620.37	15.20	上调 Up
16	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 (木犀草苷) Luteolin-7-O-glucoside (Luteolin)	脂质 Lipids	黄酮 Flavonoids	37 143.33	15.18	上调 Up
17	红车轴草素 Red trifolium	黄酮 Flavonoids	异黄酮 Isoflavones	36 614.07	15.16	上调 Up
18	鼠李柠檬素 Rhamn Limon	黄酮 Flavonoids	黄酮 Flavonoids	36 601.11	15.16	上调 Up
19	5,4-二羟基-7-甲氧基黄酮 (樱花素) 5,4-Dihydroxy-7-methoxy flavonoids (Sakurain)	黄酮 Flavonoids	黄酮 Flavonoids	30 571.11	14.90	上调 Up
20	7-甲基柚皮素 7-Methylnaringenin	黄酮 Flavonoids	黄酮 Flavonoids	29 367.41	14.84	上调 Up
1	Tuberoside R	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	781 374.07	-19.58	下调 Down
2	Tuberoside O	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	747 122.22	-19.51	下调 Down
3	Tuberoside A	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	646 496.30	-19.30	下调 Down
4	Tuberoside K	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	585 277.78	-19.16	下调 Down
5	Tuberoside E	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	562 670.37	-19.10	下调 Down
6	Tuberoside P	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	530 581.48	-19.02	下调 Down
7	Tuberoside J	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	521 022.22	-18.99	下调 Down
8	Tuberoside B	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	145 692.59	-17.15	下调 Down
9	Tuberoside I	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	136 785.19	-17.06	下调 Down
10	Tuberoside Q	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	123 207.41	-16.91	下调 Down
11	异金丝桃苷 Isohyperoside	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	103 270.37	-16.66	下调 Down
12	Tuberoside D	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	86 490.00	-16.40	下调 Down
13	6-羟基山奈酚-7-O-葡萄糖苷 6-Hydroxykaempferol-7-O-glucoside	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	70 300.37	-16.10	下调 Down
14	5-羟基吲哚-3-乙醇 5-Hydroxyindole-3-ethanol	生物碱 Alkaloids	吲哚类生物碱 Indole alkaloids	65 940.37	-16.01	下调 Down
15	万寿菊素-3-O-芸香糖苷 Marigold-3-O-rutinoidse	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	58 862.96	-15.85	下调 Down
16	马儿可皂苷元 Horsesapogenin	甾体 Steroids	甾体皂苷 Steroidal saponins	50 676.30	-15.63	下调 Down
17	6-羟基木犀草素-5-葡萄糖苷 6-Hydroxyluteolin-5-glucoside	黄酮 Flavonoids	黄酮 Flavonoids	39 412.59	-15.27	下调 Down
18	烟酸甲酯 Methyl nicotinate	生物碱 Alkaloids	生物碱 Alkaloids	39 380.74	-15.27	下调 Down
19	槲皮素-4-O-葡萄糖苷 (绣线菊苷) Quercetin-4-O-glucoside (Spiraea glycoside)	黄酮 Flavonoids	黄酮醇 Flavonols	30 874.07	-14.91	下调 Down
20	γ-L-谷氨酸-L-半胱氨酸 γ-L-glutamic acid-L-cysteine	氨基酸及其衍生物 Amino acids and their derivatives	氨基酸及其衍生物 Amino acids and their derivatives	25 250.74	-14.62	下调 Down

属于新呋甾烷型皂苷,在韭菜籽中约为多星韭籽中的 7.8×10^5 倍。从表 1 可以看出,在多星韭籽中上调幅度大的差异代谢物种类较多,主要是黄酮和甾体皂苷,而下调幅度大的差异代谢物主要是甾体皂苷。

2.4 代谢通路

差异代谢物的通路富集分析有助于了解代谢途径的变化机制,使用 KEGG PATHWAY 数据库注释检测到的差异代谢物并进行通路富集分析。在多星韭籽与韭菜籽 492 种差异代谢物中,共注释到 84 条代谢通路,其中差异代谢物富集较多且显著的通路有 2-氧代羧酸代谢、苯丙烷生物合成、黄酮和黄酮醇的生物合成、类黄酮生物合成、托烷和哌啶及吡啶生物碱的生物合成、赖氨酸代谢等(图 7)。图 7 结果表明,每种代谢途径有多种代谢物参与,部分代谢物也可参与多个代谢途径。以 $P \leq 0.01$ 为阈值,共筛选到 4 条富集极显著的通路(表 2)。因此,通过查阅相关文献,本研究构建了甾体皂苷的生物合成途径。甾体皂苷是由甾体皂苷元和糖基缩合而成的糖基皂苷。甾体皂苷有许多糖基,包括阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、呋喃糖等,在 2 组差异代谢物中,检测到多星韭籽中丙酮酸、薯蓣皂苷元、偏诺皂苷元、阿拉伯糖苷等显著上调表达,其 $\log_2(FC)$ 值分别是韭菜籽的 4.58、17.18、17.24、11.93 倍。同时发现,2 组样品间多种葡萄糖苷、鼠李糖苷、半乳糖苷以及木糖含量存在差异,推测其可能为形成甾体皂苷的底物或中间物质。

3 讨论与结论

3.1 多星韭籽与韭菜籽差异代谢物

代谢产物是生物表型的基础,可以直观有效地理解生物学过程及其机制(熊欢欢等,2019)。本研究采用 UPLC-MS/MS 的广泛靶向代谢组学技术分析 Kunth 和 Rottl 的代谢组分,结果表明 Kunth 和 Rottl 组内重复样本的相关系数均在 0.90~0.99,表明重复性极好,PCA 结果表明代谢物具有明显差异。2 种韭籽中共检测到 782 种代谢物,其中差异代谢物检测出 492 种,多星韭籽中包括 114 种上调代谢物和 378 种下调代谢物。上调代谢物中有 34 种黄酮、22 种甾体、12 种核苷酸及其衍生物、11 种酚酸、9 种有机酸、9 种其他类、6 种氨基

酸及其衍生物、6 种生物碱、4 种糖及醇类、4 种维生素、2 种萜类、2 种脂质、1 种木脂素和香豆素类以及与 1 种新木质素;下调代谢物中有 73 种黄酮、69 种脂质、46 种氨基酸及其衍生物、46 种酚酸、32 种有机酸、25 种生物碱、20 种糖及醇类物质、18 种核苷酸及其衍生物、14 种萜类、12 种甾体、10 种木脂素和香豆素类、8 种维生素、3 种鞣质以及苯乙烯、对羟基桂皮酸酐对羟基苯乙胺等。从本研究看出,不是所有的差异代谢物质在多星韭籽中都比韭菜籽高,不应过分青睐野生植物品种,而应根据研究目的与不同需求选择性加以利用。

3.2 多星韭籽与韭菜籽差异代谢通路

本研究基于 KEGG PATHWAY 数据库对差异代谢物进行注释,共获得了 84 条代谢通路,其中,4 条通路的差异代谢物多且较为显著,分别是黄酮和黄酮醇的生物合成、托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成、类黄酮生物合成、苯丙烷生物合成。其中,苯丙烷代谢途径是植物次生代谢产物合成的主要途径之一,可为下游次生代谢产物的合成提供原料。植物的许多次生代谢产物,如色素、酚酸、黄酮、类黄酮、木质素等都是由这一代谢途径及其分支途径产生(欧阳光察和薛应龙,1988;文欢等,2017)。苯丙氨酸被苯丙氨酸脱氨酶(PAL)催化产生肉桂酸,由肉桂酸羟化酶(C4H)产生对羟基香豆酸,经 4-香豆酰-CoA 连接酶(4CL)催化生成 4-香豆酸 CoA。进入下游特异性合成途径,转化为不同的苯丙素类代谢产物,包括香豆素、黄酮类、萜类、木质素、花青素等(王玉等,2019)。因此,苯丙烷类代谢通路与多星韭籽和韭菜籽中黄酮、类黄酮、萜类和酚酸类物质的差异密切相关。

葱属是百合科植物中最为重要的家族之一,而甾体皂苷是葱属植物中最重要的化学成分之一,韭菜籽中含有药用功效的甾体皂苷(张新茹等,2009;曹秀敏等,2015)。甾体皂苷具有镇静、催眠、降血糖和抗肿瘤、抗真菌、抗病毒、抗氧化、抗抑郁等重要药理活性作用(张雪等,2020)。本研究鉴定的甾体皂苷是多星韭籽中下调幅度较大的差异代谢物,但 KEGG PATHWAY 数据库缺少修饰甾体皂苷的信息,本研究无法对其上下游代谢途径进行注释,通过查阅相关文献,构建了甾体皂苷的生物合成途径(张雪等,2020;廖荣俊等,2020;单春苗等,2020;高琳,2020)。

表 2 多星韭籽与韭菜籽差异代谢物显著富集通路

Table 2 Significant enrichment pathway of differential metabolites of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

序号 No.	KEGG 通路名称 KEGG pathway name	Ko-ID	P 值 P value	百分率 Percentage (%)	化合物编号 Compound ID
1	黄酮和黄酮醇的生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis	ko00944	0.002	7.37	C03951, C12630, C12626, C12667, C12249, C05903, C21833, C12628, C01470, C12635, C12627, C05623, C03515, C05625
2	托烷, 哌啶和吡啶生物碱的生物合成 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	ko00960	0.006	4.74	C00253, C00134, C01672, C05607, C00407, C00079, C00047, C00408, C01746
3	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	ko00941	0.022	6.32	C06561, C12208, C05631, C05903, C09756, C00509, C09833, C00852, C09826, C09614, C00974, C10044
4	苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	0.037	6.84	C00315, C05610, C00082, C01772, C00852, C01494, C00079, C01175, C00761, C12208, C00423, C00482, C10945

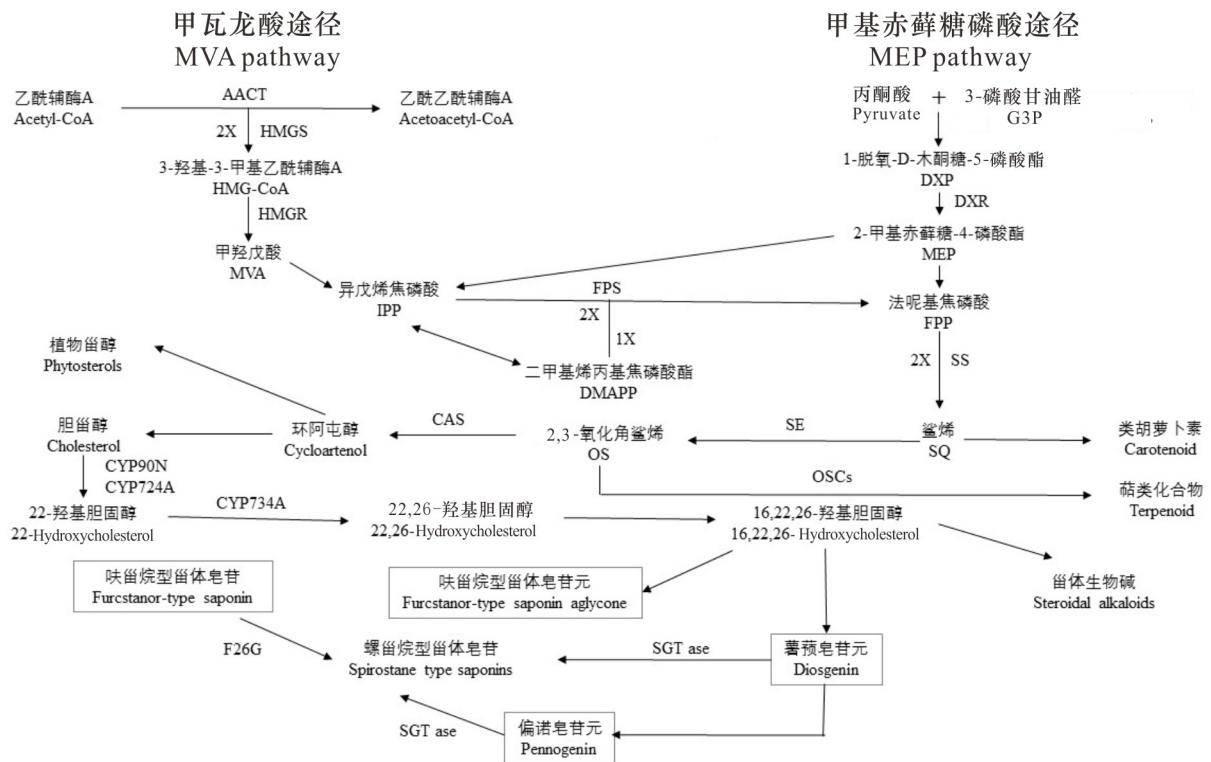


图 8 多星韭籽与韭菜籽中甾体皂苷生物合成途径

Fig. 8 Biosynthetic pathway of steroidal saponins of *Allium wallichii* seeds and *A. tuberosum* seeds

在本研究中,甾体皂苷的合成途径包括 4 个阶段。首先,经甲瓦龙酸途径(MVA)和甲基赤藓糖磷酸途径(MEP)(图 8)通过焦磷酸化、脱羧化和脱水等过程生成中间原料异戊烯焦磷酸(IPP);其次,IPP 通过法尼基焦磷酸合酶(FPS)、鲨烯合酶(SS 或 SQS)和鲨烯环氧酶(SE 或 SQE)的催化形成氧化角鲨烯(OS),在环阿屯醇合酶(CAS)的

催化作用下,生成甾体化合物的前体环阿屯醇;然后,环阿屯醇经过一系列氧化还原修饰胆甾醇,胆甾醇环化为半缩酮,半缩酮 C-26 位的羟基在葡萄糖基转移酶催化下形成糖苷键,从而形成呋甾烷型甾体皂苷;最后,呋甾烷型甾体皂苷经糖苷酶(F26G)催化水解 C-26 糖苷键生成螺甾烷型甾体皂苷。本研究检测到多星韭籽中丙酮酸、薯蓣皂

昔元、偏诺皂昔元、阿拉伯糖昔等显著上调表达,同时发现,2 组样品间多种葡萄糖昔、多种鼠李糖昔、多种半乳糖昔以及木糖存在差异,推测其可能为形成甾体皂昔的底物或中间物质。

甾体化合物是具有环戊烷多氢菲基本碳架的天然活性物质统称。皂昔是昔元为三萜类化合物或螺甾烷类化合物的一种糖昔,甾体皂昔主要有螺甾烷醇和呋甾烷醇,还有少量胆甾烷醇与孕甾烷型皂昔(于晶等,2020)。甾体皂昔作为植物中的一种重要次生代谢产物,具有巨大的开发前景和应用潜力,但由于产生甾体皂昔的植物多为多年生植物,生命周期长,甾体皂昔含量低,不能满足商业需求。本研究在多星韭籽与韭菜籽中共检测出 36 种甾体皂昔,可以作为甾体皂昔提取的新植物来源,通过进一步深入提取分离药理活性较高的甾体皂昔类化学成分,可实现生理活性物质的大量生产,有助于解决甾体皂昔植物资源短缺的问题,构建的韭籽甾体皂昔生物合成途径有助于了解不同种类药用植物中甾体皂昔代谢途径差异。

本研究通过广泛靶向代谢组学技术对野生型多星韭籽与栽培型平韭 6 号韭菜籽成分进行广靶无偏分析,基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释并获得了相应通路,构建了韭籽中生物活性物质甾体皂昔的生物合成途径,为韭籽有效成分及药理机理深入研究提供了一定的基础,为韭籽有效成分的代谢途径解析提供参考。本研究结果表明多星韭籽代谢物组成丰富,多种成分具有药理性作用,是很好的野生药用植物资源,可推动其自然野生资源的开发利用与保护,为进一步开发及利用多星韭植物资源提供理论依据。

参考文献:

- BRENNAN L, 2013. Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives [J]. *Biochem Soc Trans*, 41(2): 670-673.
- CAO XM, QIAO BJ, LI KH, et al., 2015. Extraction process optimization of leek rapeseed active ingredient [J]. *Farm Prod Proc*, (1): 27-28. [曹秀敏, 乔保健, 李克寒, 等, 2015. 韭菜籽活性成分提取工艺的优化研究 [J]. *农产品加工*, (1): 27-28.]
- CASAS-FERREIRA AM, NOGAL-SÁNCHEZ MD, PÉREZ-PAVÓN JL, et al., 2019. Non-separative mass spectrometry methods for non-invasive medical diagnostics based on volatile organic compounds: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 1045: 10-22.
- Chinese Botanical Committee of the Chinese Academy of Sciences, 1980. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]// *Angiosperms, Monocotyledonous, Liliaceae: One*. Beijing: Science Press: 210. [中国科学院中国植物志委员会, 1980. *中国植物志* [M]//被子植物门, 单子叶植物纲, 百合科: 一. 北京: 科学出版社: 210.]
- DING WH, MO SJ, ZHANG PF, 2007. Analysis of the different feature of Jiucaiping stone forest forms in Guizhou [J]. *J Bijie Univ*, 25(4): 94-99. [丁卫红, 莫世江, 张鹏飞, 2007. 贵州韭菜坪石林形态差异性分析 [J]. *毕节学院学报*, 25(4): 94-99.]
- FATMA K, JOACHIM K, DONG YS, et al., 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content [J]. *Plant J*, 50(6): 967-981.
- GAO L, 2020. Separation and identification of steroidal saponins from *Asparagi radix* [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine: 60-61. [高琳, 2020. 天冬中甾体皂昔的分离鉴定 [D]. 天津: 天津中医药大学: 60-61.]
- GUO FL, QIU ZM, DENG XH, et al., 2013. Survey on distribution status of *Allium ovalifolium* Hand.-Mzt. resources in highland [J]. *Chin Veg*, (2): 87-90. [郭凤领, 邱正明, 邓晓辉, 等, 2013. 高山特有蔬菜资源: 卵叶韭的调查 [J]. *中国蔬菜*, (2): 87-90.]
- HUANG XR, 2017. Study on the nutritional components of black sesame and black peanut based on metabolomics [D]. Wuhan: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 44. [黄晓荣, 2017. 基于代谢组学的黑芝麻黑花生营养成分挖掘与识别研究 [D]. 武汉: 中国农业科学院: 44.]
- JIAN L, ZHU LQ, 2009. Comparative analysis of the nutritional components of several *Allium* crops in Guizhou Province [J]. *J Changjiang Veg*, (1b): 30-32. [蹇黎, 朱利泉, 2009. 贵州几种葱属植物的营养成分比较分析 [J]. *长江蔬菜*, (1b): 30-32.]
- LI H, ZHANG MF, MIAO MS, 2017. Modern research and thinking of leek rapeseed [J]. *Acta Chin Med*, 32(3): 430-432. [李欢, 张梦飞, 苗明三, 2017. 韭菜籽的现代研究与思考 [J]. *中医学报*, 32(3): 430-432.]
- LI LL, 2020. Study on chemical differentiation of different types of *Panax* genus products by using plant metabolomics [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine: 69-70. [李乐乐, 2020. 应用植物代谢组学方法研究不同人参制品的化学成分差异 [D]. 长春: 长春中医药大学: 69-70.]
- LIAO RJ, YANG Y, YE BH, et al., 2020. Transcriptome analysis of rhizome of *Polygonatum cyrtoneura* and identification of candidate genes involved in biosynthetic pathway of steroidal saponin [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 45(7): 1648-1656. [廖荣俊, 杨阳, 叶碧欢, 等, 2020. 多花黄精根茎的转录组分析与甾体皂昔生物合成相关基因发掘 [J]. *中国中药杂志*, 45(7): 1648-1656.]
- LIU JT, WANG S, ZHANG WM, et al., 2007. Review on research progress of bioactive constituents in *Allium* species

- [J]. Food Sci, 28(4): 350-352. [刘建涛, 王杉, 张维民, 等, 2007. 葱属植物生物活性物质的研究进展 [J]. 食品科学, 28(4): 350-352.]
- LIU PP, XU YZ, WANG JX, et al., 2015. Simultaneous determination of the content of four nucleosides in the Yi medicine Duoxing *Allium* by UPLC method [J]. J Chin Med Mat, 38(8): 1618-1621. [刘盼盼, 许云章, 王静霞, 等, 2015. UPLC 法同时测定彝药多星韭中四种核苷类成分的含量 [J]. 中药材, 38(8): 1618-1621.]
- NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E, 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 29(11): 1181-1189.
- OUYANG GC, XUE YL, 1988. Physiological role and regulation of phenylpropane metabolism in plant [J]. Plant Physiol J, (3): 9-16. [欧阳光察, 薛应龙, 1988. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控 [J]. 植物生理学通讯, (3): 9-16.]
- RAO GD, LIU XX, ZHA WW, et al., 2017. Metabolomics reveals variation and correlation among different tissues of olive (*Olea europaea* L.) [J]. Open Biol, 6(9): 1317-1323.
- SHAN CM, WANG CK, SHI YY, et al., 2020. Identification of key enzyme genes involved in biosynthesis of steroidal saponins and analysis of biosynthesis pathway in *Polygonatum cyrtonema* [J]. Chin J Chin Mat Med, 45(12): 2847-2857. [单春苗, 王晨凯, 施圆圆, 等, 2020. 多花黄精甾体皂苷生物合成途径分析及关键酶基因研究 [J]. 中国中药杂志, 45(12): 2847-2857.]
- SI MZ, ZHANG CY, LI L, et al., 2014. A study on the volatile compounds of *Allium* species [J]. J Chuxiong Univ, 29(3): 17-23. [司民真, 张川云, 李伦, 等, 2014. 葱属植物挥发性物质研究 [J]. 楚雄师范学院学报, 29(3): 17-23.]
- SUMNER LW, LEI ZT, NIKOLAU BJ, et al., 2015. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects [J]. Nat Prod Rep, 32(2): 212-229.
- SUN J, YIN GY, DING MM, et al., 2014. Study on extraction and antioxidant activity of protein from Chinese chive seed [J]. Sci Technol Food Ind, 12(35): 291-294. [孙婕, 尹国友, 丁蒙蒙, 等, 2014. 韭菜籽蛋白的提取及抗氧化活性研究初探 [J]. 食品工业科学, 12(35): 291-294.]
- TANG HQ, WANG XY, ZHANG ZN, et al., 2020. Pollination biology of *Allium wallichii* [J]. Guihaia, 40(11): 1613-1622. [唐汉青, 王晓月, 张子楠, 等, 2020. 多星韭 (*Allium wallichii*) 的传粉生态学初探 [J]. 广西植物, 40(11): 1613-1622.]
- WANG HP, QIU Y, LI FW, et al., 2017. Investigation and nutrition components analysis of wild chives in Hezhang County of Guizhou Province [J]. J Plant Genet Resour, 18(6): 1137-1144. [王海平, 邱杨, 李方威, 等, 2017. 贵州赫章县野生韭菜资源调查与营养成分分析 [J]. 植物遗传资源学报, 18(6): 1137-1144.]
- WANG Y, YANG X, YANG RJ, et al., 2019. Advances in research of MYB transcription factors in regulating phenylpropane biosynthesis [J]. J Anhui Agric Univ, 46(5): 859-864. [王玉, 杨雪, 杨蕊菁, 等, 2019. 调控苯丙烷类生物合成的 MYB 类转录因子研究进展 [J]. 安徽农业大学学报, 46(5): 859-864.]
- WEN H, ZHANG DY, PENG C, et al., 2017. Transcriptional analysis of phenylpropanoid metabolic pathway in *Gastrodia elata* [J]. Chin Med Mat, 40(4): 789-796. [文欢, 张大燕, 彭成, 等, 2017. 天麻苯丙烷代谢途径的转录组学分析 [J]. 中药材, 40(4): 789-796.]
- XIONG HH, ZHANG HG, ZHANG L, et al., 2019. Metabonomics analysis of *Larix olgensis* under drought stress [J]. J NE For Univ, 47(4): 1-7. [熊欢欢, 张含国, 张磊, 等, 2019. 干旱胁迫下长白落叶松的代谢组学分析 [J]. 东北林业大学学报, 47(4): 1-7.]
- YAO SQ, MO GY, HAN LT, 2020. Preliminary study on the mechanism of inhibitory effect of triterpenoid saponins of *Anemone flaccida* on liver cancer based on metabonomics [J]. J Hubei Univ Chin Med, 22(4): 5-9. [姚诗琪, 莫国艳, 韩林涛, 2020. 基于代谢组学研究鹅掌草三萜皂苷抑制肝癌初步作用机制 [J]. 湖北中医药大学学报, 22(4): 5-9.]
- YU J, WEN RX, YAN QX, et al., 2020. Bioactive constituents of *Allium* and their physiological functions: A review [J]. Food Sci, 41(7): 255-265. [于晶, 温荣欣, 闫庆鑫, 等, 2020. 葱属植物活性物质及其生理功能研究进展 [J]. 食品科学, 41(7): 255-265.]
- ZHANG X, WANG XF, ZHAO RH, et al., 2020. Biosynthesis of steroidal saponins in herbs [J]. Chin J Exp Trad Med For, 26(14): 225-234. [张雪, 王希付, 赵荣华, 等, 2020. 药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 26(14): 225-234.]
- ZHANG XR, YANG XH, WANG TX, 2009. The latest research progress of steroidal saponins and their pharmacological effects in *Allium* plants [J]. Pharm J Chin PLA, 25(2): 165-169. [张新茹, 杨晓虹, 王天晓, 2009. 葱属植物中甾体皂苷及其药理作用最新研究进展 [J]. 解放军药学报, 25(2): 165-169.]
- ZHU KX, LIN CS, TANG BX, et al., 2017. Experimental study on seed germination of wild ornamental plant of *Allium wallichii* [J]. J Liupanshui Univ, 29(3): 32-35. [朱宽香, 林长松, 唐彬旭, 等, 2017. 野生观赏植物多星韭种子萌发实验研究 [J]. 六盘水师范学院学报, 29(3): 32-35.]
- ZOU XJ, HUANG RF, ZHAI SH, 2013. Detection of hexaploid and mechanisms of polyploidy formation in *Allium wallichii* Kunth [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 33(6): 1114-1122. [邹晓菊, 黄瑞复, 翟书华, 2013. 六倍体多星韭的发现及多星韭种内倍性组成及演化的分析 [J]. 西北植物学报, 33(6): 1114-1122.]
- ZOU ZM, YU DQ, CONG PZ, 1999. Research progress in the chemical constituents and pharmacological actions of *Allium* species [J]. Acta Pharm Sin, 34(5): 395-400. [邹忠梅, 于德泉, 丛浦珠, 1999. 葱属植物化学及药理研究进展 [J]. 药学报, 34(5): 395-400.]