

# 基于转录组测序的金柑类黄酮糖基转移酶基因的初步分析

谭 嫣<sup>1</sup>, 马小迪<sup>1</sup>, 王久照<sup>1</sup>, 刘小刚<sup>1,3</sup>, 曾 明<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; <sup>2</sup>南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715; <sup>3</sup>农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

**摘 要:** 植物体内类黄酮通常以糖基化的形式存在, 其糖基化由 UDP-糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 催化完成。以‘浏阳金柑’果实为研究对象, 利用 UPLC G2-S QTOF 技术对其类黄酮种类进行鉴定, 共检测出 11 种类黄酮, 包括 C-葡萄糖苷类黄酮、C-新橙皮糖苷类黄酮和 O-新橙皮糖苷类黄酮。基于转录组测序, 筛选出 49 个金柑果实发育过程中高表达的 UGT 基因。进化分析显示, 13 个高表达的 *FcUGT* 可能参与了类黄酮的糖基化修饰过程。其中, 1 个 *FcUGT* 编码 C-葡萄糖基转移酶, 参与了 C-葡萄糖苷类黄酮的修饰过程; 9 个 *FcUGT* 编码 7-O-葡萄糖基转移酶, 可能参与了 O-新橙皮糖苷类黄酮的修饰过程; 3 个 *FcUGT* 编码 1,2-鼠李糖基转移酶, 可能参与了 O-或 C-新橙皮糖苷类黄酮的修饰过程。

**关键词:** 金柑; 类黄酮; 糖基转移酶基因; 转录组分析

**中图分类号:** S 666

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 04-0664-13

## A Preliminary Study on UGTs Involving Glycosylation of Flavonoids Based on Transcriptome Analyses of *Fortunella crassifolia* Fruits

TAN Yan<sup>1</sup>, MA Xiaodi<sup>1</sup>, WANG Jiuzhao<sup>1</sup>, LIU Xiaogang<sup>1,3</sup>, and ZENG Ming<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Horticultural Crop Germplasm Resources Utilization of Ministry of Agriculture, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

**Abstract:** O- and C-glycoside flavonoids are important metabolites in *Fortunella crassifolia* plants. Glycosylation of flavonoids is catalyzed by UDP-glycosyltransferase (UGT). In this study, we determined the flavonoid glycosides in kumquat fruits by using UPLC G2-S QTOF. A total of 11 flavonoid glycosides were detected, including C-glucoside, O-neohesperidoside, and C-neohesperidoside flavonoids. Subsequently, based on transcriptomes, we isolated 49 UGT genes with high expression levels in kumquat fruits. Further phylogenetic analysis showed that 13 UGTs of them might be involved in the glycosylation process of flavonoids. One UGT encoding C-glucosyltransferase catalyzed the C-glucosylation, 9 UGTs encoding 7-O-glucosyltransferase were involved in the 7-O-glucosylation, and 3 UGTs encoding

收稿日期: 2018-11-28; 修回日期: 2019-03-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31600235); 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室开放基金资助课题 (NYZS2017-1-1)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zengming@swu.edu.cn)

1,2-rhamnosyltransferase, can perform rhamnosylation of flavonoids.

**Keywords:** *Fortunella crassifolia*; flavonoids; UDP-glycosyltransferases gene; transcriptome analyses

类黄酮是植物重要的次生代谢产物之一, 通常在体内以糖基化的形式存在。糖基化可增加类黄酮在细胞内的稳定性、溶解性并加强其转运特性。类黄酮的糖基化是由 UDP - 糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 催化完成。该酶属于糖基转移酶超家族中的第 1 家族, 可催化 UDP - 糖 (UDP-sugar) 以糖苷键形式连接到类黄酮苷元或类黄酮糖苷分子上 (Masada et al., 2009; Joe et al., 2010)。最早的报道是在玉米胚乳抽提物中发现了糖基化黄酮醇和花色苷 (Ralston et al., 1988)。在此工作的基础上, 相继从大麦 (Wise et al., 1990)、金鱼草 (Matin et al., 1991)、碧冬茄 (Brugliera et al., 1994)、三花龙胆 (Tanaka et al., 1996)、马铃薯 (Moebs et al., 1997; Yamazaki et al., 1999)、拟南芥 (Jones et al., 2003; Tohge et al., 2005; Kubo et al., 2007; Yonekura-Sakakibara et al., 2007, 2008, 2012, 2014) 和牡丹 (舒庆艳 等, 2018) 等植物中克隆获得了 UGT 基因。

生物类黄酮在柑橘果实中多以糖苷形式存在, 且以黄烷酮 - O - 糖苷类、黄酮 - O - 糖苷类和黄酮 - C - 糖苷类含量最为丰富 (Gattuso et al., 2007; Abad-Garcia et al., 2014; 陈嘉景 等, 2016; 曹运琳 等, 2018)。在高等植物中, UGT 通常以家族的形式存在, 且数量众多。例如, 在拟南芥中 UGT 家族包括 120 个家族成员, 蒺藜苜蓿中包括 164 个成员 (Caputi et al., 2012), 甜橙中包括 123 个成员。这些家族成员在植物体内参与广泛的生理生化过程, 且糖基化修饰的底物类型众多, 如类黄酮、萜类、固醇、生物碱、酚类、激素、糖类、蛋白质和脂质 (Paquette et al., 2003; Lim & Bowles, 2004; Bowles et al., 2005; Gachon et al., 2005)。如何从这些家族成员中鉴定出参与类黄酮糖基化修饰的关键 UGT 基因, 是类黄酮合成调控研究中最关键的一步。本研究中首先利用超高效液相色谱—四级杆飞行时间串联质谱联用仪 (UPLC G2-S QTOF) 对‘浏阳金柑’果实中的类黄酮种类进行鉴定, 然后基于转录组测序筛选果实发育过程中高表达的 UGT 基因, 利用进化分析对 UGT 基因进行功能预测, 以期为进一步的功能研究提供候选参考基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料为树龄约 10 年的‘浏阳金柑’ (*Fortunella crassifolia* Swingle), 种植于中国农业科学院柑桔研究所国家果树种质重庆柑桔圃。果实样品采集时间为花后 15、31、69、99、130 和 156 d。对花后 15 和 31 d 的果实整体进行分析, 其他时期果皮果肉分离。用于转录组分析及 qRT-PCR 的样品直接置于 - 80 °C 冰箱; 用于类黄酮定性分析的样品先用烘箱 (60 °C) 烘至恒重, 然后用磨样机磨碎, 过 40 目筛子, 再置于 - 80 °C 冰箱。

化学标准品: 维采宁 - 2 (Apigenin-6,8-di-C-glucoside, Vicenin-2)、野漆树苷 (Apigenin 7-O-neohesperidoside, Rhoifolin)、柚皮苷 (Naringenin 7-O-neohesperidoside, Naringin)、枸橼苷 (Isosakuranetin-7-O-neohesperidoside, Poncirin) 购于成都克洛玛生物科技有限公司。

### 1.2 类黄酮的测定

类黄酮提取方法: 称取烘干样品 0.5 g 于 10 mL 离心管, 加入 7 mL 纯甲醇, 混匀, 超声破碎 30

min (功率 60%, 水温 45 °C), 5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液于 25 mL 棕色容量瓶, 残渣加入 7 mL 纯甲醇, 重复提取 3 次, 用甲醇定容至 25 mL。取适宜提取液, 加入适量去离子水稀释, 0.2 μm 膜过滤, 置于 4 °C 冰箱备用。

UPLC 条件: 流动相 A 为 0.01% 甲酸, B 为乙腈; 流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 40 °C; 进样量为 1 μL; 检测波长为 283、330、365 nm; 检测范围为 200 ~ 400 nm。柱子为 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)。浓度梯度: 0 min: 90% A + 10% B; 2 min: 80% A + 20% B; 5 min: 75% A + 25% B; 9 min: 65% A + 35% B。

质谱条件: 检测波长为 240 ~ 400 nm; 毛细管电压设定为 1 V; 锥孔电压设定为 40 V; 离子源温度设定为 100 °C; 脱溶剂气温度设定为 400 °C; 锥孔气体流速设定为 50 L · h<sup>-1</sup>; 去离子气流速设定为 800 L · h<sup>-1</sup>; 低能设定为 6 V; 高能设定为 20 ~ 40 V; 扫描范围设定为 100 ~ 1 000 m/z; 扫描时间为 0.2 s; 流速为 10 μL · min<sup>-1</sup>; 柱温设定为 40 °C。

### 1.3 转录组测序及分析

采用 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, 中国) 提取果实总 RNA, 并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 精确检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性。

用带有 Olig(dT) 的磁珠富集 mRNA, 将得到的 mRNA 反转录合成 cDNA, 对其进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 进行片段大小选择, 最后进行 PCR 富集得到最终 cDNA 文库。利用 Illumina HiSeq 测序平台进行 PE125 测序分析 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

转录组数据分析流程如下: 利用 Trim Galore! 软件对原始 Raw reads 数据过滤得到高质量的 Clean reads; 利用 HISAT2 软件将 Clean reads 比对到参考基因组后, 使用 Cufflinks 软件将比对的 Clean reads 组装成 Unigene, 利用 Cuffnorm 软件分析基因表达量并采用 FPKM (Fragments Per Kilobase Million) 方法对测序数据标准化处理。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 验证

用 FastKing RT Kit (TIANGEN, 中国) 反转录合成 cDNA, 随后用 FastFire qPCR PreMix (SYBR Green) (TIANGEN, 中国) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。反应体系 25 μL: 2× FastFire qPCR PreMix 12.5 μL, 正、反引物各 0.75 μL, cDNA 模板 2.0 μL, 水 9.0 μL。反应条件: 95 °C 1 min, 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 共 40 个循环。反应在 CFX-384 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 上完成。引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 内参基因为 *β-Actin*。

**表 1 用于 qRT-PCR 分析的引物序列**  
**Table 1 Oligonucleotide sequences for primers used in qRT-PCR**

基因 Gene	正向引物 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物 (5' - 3') Reverse primer sequence
<i>FcUGT25</i>	GAGAGAACTTTGACGGACAATG	CCCAATGTAATCACAATAAGG
<i>FcUGT23</i>	AAGACTTTGGTGGCCTTTTCG	CATTCACTCCCAAGTGACAG
<i>FcUGT49</i>	CCTCAGTATCACACGACTAAAGG	CATTGTAAGCATCACCTGATG
<i>FcUGT45</i>	TTGGCCCTGTTTCCTTATGCAATAG	CTCCTTCACCGCCATCATTCTTG
<i>FcUGT40</i>	CTTGACGCAATCACAAATGAAG	ATATAGCCTCAGGCAATTTGATG
<i>FcUGT43</i>	CCGGAGGAGAAAAGTTTGGG	CTAATGTAAAGAACTGAATTGG
<i>β-Actin</i>	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG	CCAAGCAGCATGAAGATCAA

2 结果与分析

2.1 基于 UPLC G2-S QTOF 的浏阳金柑果实类黄酮种类的检测

采用 UPLC G2-S QTOF 技术分析了浏阳金柑果实中类黄酮的种类, 鉴定出了 11 种类黄酮, 通过与标准品的保留时间、一级质谱、二级质谱比对, 能够准确定性 4 种类黄酮, 其他 7 种由于没有商业化的标准品, 仅能参照前人的研究结果 (Ogawa et al., 2001; Barreca et al., 2011; Lou et al., 2015) 进行定性。图 1 和表 2 为花后 31 d 金柑果实类黄酮的基峰离子流 (BPI) 图和质谱数据, 峰 1 和峰 5 分别代表维采宁-2 (Apigenin-6,8-di-C-glucoside, Vicenin-2) 和 3,5-双碳- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基根皮素 (3',5'-di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin), 属于双碳糖苷类黄酮。这两种类黄酮的糖基化修饰主要由 C-葡萄糖基转移酶 (C-glucosyltransferase, C-UGT) 催化完成。该酶催化 UDP-葡萄糖 (UDP-glucose) 的葡萄糖基, 以 C-C 键的形式连接到类黄酮苷元分子上 (表 3)。峰 2、峰 3、峰 4、峰 8 和峰 9 分别代表木犀草素-8-C-新橙皮糖苷 (Luteolin-8-C-neohesperidoside)、木犀草素-6-C-新橙皮糖苷 (Luteolin-6-C-neohesperidoside)、芹菜素-8-C-新橙皮糖苷 (Apigenin-8-C-neohesperidoside)、刺槐黄素-8-C-新橙皮糖苷 (Margaritene 或 Acacetin-8-C-neohesperidoside)、刺槐黄素-6-C-新橙皮糖苷 (Isomargaritene 或 Acacetin-6-C-neohesperidoside), 属于单 C 糖苷类黄酮。这几种类黄酮的糖基化修饰需要两种 UGT, 首先由 C-UGT 将 UDP-葡萄糖的葡萄糖基以 C-C 键的形式连接到类黄酮苷元分子上, 而后由 1,2-鼠李糖基转移酶 (1,2-rhamnosyltransferase, 1,2RhaT) 将 UDP-鼠李糖 (UDP-rhamnose) 的鼠李糖基团连接到葡萄糖基团上, 形成新橙皮糖苷 (表 3)。峰 6、峰 7、峰 10 和峰 11 分别代表 4 个 O-糖苷类黄酮, 即野漆树苷 (Rhoifolin 或 Apigenin7-O-neohesperidoside)、柚皮苷 (Naringin 或 Naringenin-7-O-neohesperidoside)、金柑苷 (Fortunellin 或 Acacetin7-O-neohesperidoside)、枸橼苷 (Poncirin 或 Isosakuranetin7-O-neohesperidoside)。这几种类黄酮的糖基化修饰涉及两种 UGT, 首先由 7-O-葡萄糖基转移酶 (7-O-glucosyltransferase, 7-O-UGT) 将 UDP-葡萄糖的葡萄糖基以 O-C 键的形式连接到类黄酮苷元分子 7-OH 位上, 而后再由 1,2RhaT 催化 UDP-鼠李糖 (UDP-rhamnose) 的鼠李糖基团连接到葡萄糖基团上, 形成新橙皮糖苷。

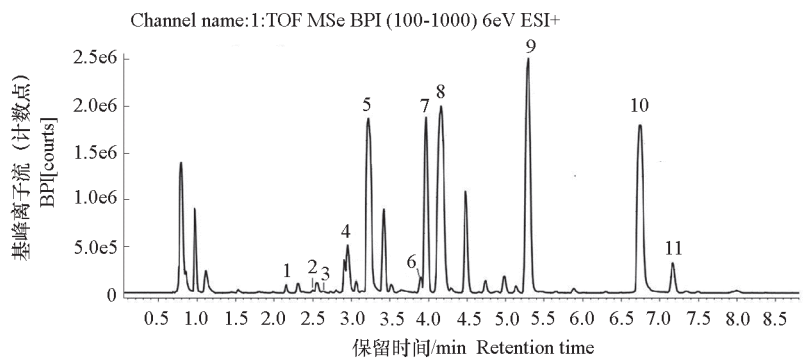


图 1 浏阳金柑花后 31 d 的果实正离子模式下基峰离子流图  
Fig. 1 The BPI chromatograms corresponding to positive signals of kumquat fruits at 31 days after flowering

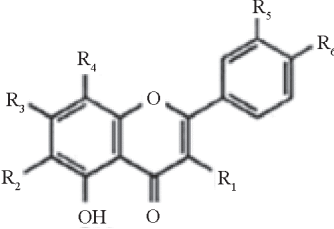
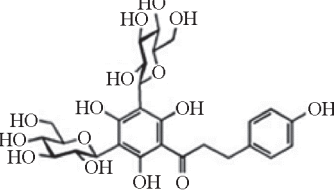
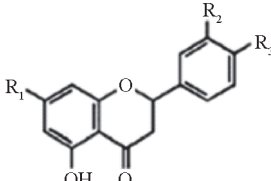
表 2 浏阳金柑果实中类黄酮的鉴定

Table 2 Identification of flavonoids in kumquat fruit by UPLC-Q-TOF-MS

峰号 Peak No.	化合物 Identification	保留时 间/min RT	MS 正离子模式 MS data on[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	MS 负离子模式 MS data on [M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> 正离子模式 MS <sup>2</sup> data on [M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> 负离子模式 MS <sup>2</sup> data on [M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )
1	维采宁 - 2 Apigenin-6,8-di- <i>C</i> -glucoside	2.15	[M+H] <sup>+</sup> = 595.1669 (1.1)	[M-H] <sup>-</sup> = 593.1519 (0.7)	577.1558[M+H-18] <sup>+</sup> 559.1459[M+H-36] <sup>+</sup> 529.1330[M+H-66] <sup>+</sup> 475.1178[M+H-120] <sup>+</sup> 457.1118[M+H-138] <sup>+</sup>	575.1406[M-H-18] <sup>-</sup> 503.1186[M-H-90] <sup>-</sup> 473.1077[M-H-120] <sup>-</sup> 383.0747[M-H-210] <sup>-</sup> 353.0635[M-H-240] <sup>-</sup>
2	木犀草素 - 8 - <i>C</i> - 新橙皮糖苷 Luteolin-8- <i>C</i> -neohesperidoside	2.50	[M+H] <sup>+</sup> = 595.1665 (0.73)	[M-H] <sup>-</sup> = 593.1516 (0.7)	577.1519[M+H-18] <sup>+</sup> 449.1082[M+H-146] <sup>+</sup> 431.0985[M+H-164] <sup>+</sup> 395.0762[M+H-200] <sup>+</sup> 383.0752[M+H-212] <sup>+</sup> 329.0649[M+H-266] <sup>+</sup>	575.1437[M-H-18] <sup>-</sup> 473.1080[M-H-120] <sup>-</sup> 447.1845[M-H-146] <sup>-</sup> 429.0813[M-H-164] <sup>-</sup> 327.0487[M-H-266] <sup>-</sup> 285.0397[M-H-308] <sup>-</sup>
3	木犀草素 - 6 - <i>C</i> - 新橙皮糖苷 Luteolin-6- <i>C</i> -neohesperidoside	2.63	[M+H] <sup>+</sup> = 595.1652 (-0.56)	[M-H] <sup>-</sup> = 593.1512 (0.03)	577.1790[M+H-18] <sup>+</sup> 449.1090[M+H-146] <sup>+</sup> 431.0988[M+H-164] <sup>+</sup> 329.0641[M+H-266] <sup>+</sup> 287.0057[M+H-308] <sup>+</sup>	575.1094[M-H-120] <sup>-</sup> 429.0803[M-H-164] <sup>-</sup> 327.0486[M-H-266] <sup>-</sup> 285.0281[M-H-308] <sup>-</sup>
4	芹菜素 - 8 - <i>C</i> - 新橙皮糖苷 Apigenin-8- <i>C</i> -neohesperidoside	2.95	[M+H] <sup>+</sup> = 579.1710 (-0.12)	[M-H] <sup>-</sup> = 577.1565 (0.19)	561.1620[M+H-18] <sup>+</sup> 459.1231[M+H-120] <sup>+</sup> 433.1121[M+H-146] <sup>+</sup> 415.1015[M+H-164] <sup>+</sup> 271.0586[M+H-308] <sup>+</sup>	457.1132[M-H-120] <sup>-</sup> 431.0993[M-H-146] <sup>-</sup> 413.0856[M-H-164] <sup>-</sup> 269.0613[M-H-308] <sup>-</sup>
5	3,5 - 双碳 - $\beta$ - <i>D</i> - 吡喃葡萄糖基 根皮素 3',5'-di- <i>C</i> - $\beta$ - glucopyranosylphloretin	3.21	[M+H] <sup>+</sup> = 599.1985 (1.44)	[M-H] <sup>-</sup> = 597.1829 (0.37)	581.1864[M+H-18] <sup>+</sup> 563.1757[M+H-36] <sup>+</sup> 545.1649[M+H-54] <sup>+</sup> 461.1310[M+H-138] <sup>+</sup>	579.1724[M-H-18] <sup>-</sup> 561.1600[M-H-36] <sup>-</sup> 507.1495[M-H-90] <sup>-</sup> 489.1389[M-H-108] <sup>-</sup> 477.1390[M-H-120] <sup>-</sup> 459.1283[M-H-138] <sup>-</sup>
6	野漆树苷 Apigenin7- <i>O</i> -neohesperidoside	3.90	[M+H] <sup>+</sup> = 579.1709 (0.10)	[M-H] <sup>-</sup> = 577.1569 (0.58)	433.1121[M+H-146] <sup>+</sup> 271.0588[M+H-308] <sup>+</sup>	431.1009[M-H-146] <sup>-</sup> 413.0862[M-H-164] <sup>-</sup> 269.0433[M-H-308] <sup>-</sup>
7	柚皮苷 Naringenin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	3.97	[M+Na] <sup>+</sup> = 603.1693 (0.86)	[M-H] <sup>-</sup> = 579.1724 (0.48)	435.3324[M+H-146] <sup>+</sup> 419.1119[M+H-162] <sup>+</sup> 273.0743[M+H-308] <sup>+</sup>	459.1155[M-H-120] <sup>-</sup> 313.0887[M-H-266] <sup>-</sup> 271.0589[M-H-308] <sup>-</sup>
8	刺槐黄素 - 8 - <i>C</i> - 新橙皮糖苷 Acacetin-8- <i>C</i> -neohesperidoside	4.15	[M+H] <sup>+</sup> = 593.1879 (1.38)	[M-H] <sup>-</sup> = 591.1725 (-0.57)	575.1759[M+H-18] <sup>+</sup> 473.1435[M+H-120] <sup>+</sup> 447.1279[M+H-146] <sup>+</sup> 429.1129[M+H-164] <sup>+</sup> 285.0743[M+H-308] <sup>+</sup>	573.0654[M-H-18] <sup>-</sup> 471.1282[M-H-120] <sup>-</sup> 445.1123[M-H-146] <sup>-</sup> 427.1011[M-H-164] <sup>-</sup> 307.0583[M-H-284] <sup>-</sup>
9	刺槐黄素 - 6 - <i>C</i> - 新橙皮糖苷 Acacetin-6- <i>C</i> -neohesperidoside	5.28	[M+H] <sup>+</sup> = 593.1883 (1.85)	[M-H] <sup>-</sup> = 591.1722 (-0.3)	575.1756[M+H-18] <sup>+</sup> 473.1417[M+H-120] <sup>+</sup> 447.1278[M+H-146] <sup>+</sup> 429.1170[M+H-164] <sup>+</sup> 285.0740[M+H-308] <sup>+</sup>	573.1671[M-H-18] <sup>-</sup> 471.1279[M-H-120] <sup>-</sup> 445.1119[M-H-146] <sup>-</sup> 427.1009[M-H-164] <sup>-</sup> 307.0580[M-H-284] <sup>-</sup>
10	金柑苷 Acacetin7- <i>O</i> -neohesperidoside	6.74	[M+H] <sup>+</sup> = 593.1878 (1.37)	[M-H] <sup>-</sup> = 591.1729 (0.96)	575.1755[M+H-18] <sup>+</sup> 473.1389[M+H-120] <sup>+</sup> 447.1277[M+H-146] <sup>+</sup> 429.1168[M+H-164] <sup>+</sup> 285.0758[M+H-308] <sup>+</sup>	471.1300[M-H-120] <sup>-</sup> 445.1152[M-H-146] <sup>-</sup> 427.1053[M-H-164] <sup>-</sup> 307.0623[M-H-284] <sup>-</sup>
11	枸橼苷 Isosakuranetin7- <i>O</i> -neohesperidoside	7.16	[M+H] <sup>+</sup> = 595.2025 (0.32)	[M-H] <sup>-</sup> = 593.1874 (-0.18)	449.1439[M+H-146] <sup>+</sup> 287.0904[M+H-308] <sup>+</sup>	285.0738[M-H-308] <sup>-</sup>

上述分析表明, 浏阳金柑类黄酮糖基化过程主要涉及 3 类 UGT, 包括 *C*-UGT、7-*O*-UGT 及 1,2RhaT。因 Ito 等 (2017) 报道了金柑中的 *C*-UGT 基因, 因此, 本研究中的基因筛选将围绕 7-*O*-UGT 和 1,2RhaT 展开。

表 3 浏阳金柑果实中类黄酮的基本结构  
Table 3 Structures for flavonoids found in kumquat fruits

类黄酮苷元结构 Flavonoid aglycones	峰号 Peak No.	替代基团 Substitute group						化学结构式 Chemical Structure	可能参与的 UGT Possible UGT involved in the glycosylation
		R1	R2	R3	R4	R5	R6		
	1	H	Glu	OH	Glu	H	OH	维采宁 - 2 Apigenin-6,8-di-C-glucoside	C-UGT
	2	H	H	OH	Nh	OH	OH	木犀草素 - 8-C - 新橙皮糖苷 Luteolin-8-C-neohesperidoside	C-UGT and 1,2RhaT
	3	H	Nh	OH	H	OH	OH	木犀草素 - 6-C - 新橙皮糖苷 Luteolin-6-C-neohesperidoside	C-UGT and 1,2RhaT
	4	H	H	OH	Nh	H	OH	芹菜素 - 8-C - 新橙皮糖苷 Apigenin-8-C-neohesperidoside	C-UGT and 1,2RhaT
	6	H	H	O-Nh	H	H	OH	野漆树苷 Apigenin7-O-neohesperidoside	7-O-UGT and 1,2RhaT
	8	H	H	OH	Nh	H	OMe	刺槐黄素 - 8-C - 新橙皮糖苷 Acacetin-8-C-neohesperidoside	C-UGT and 1,2RhaT
	9	H	Nh	OH	H	H	OMe	刺槐黄素 - 6-C - 新橙皮糖苷 Acacetin-6-C-neohesperidoside	C-UGT and 1,2RhaT
	10	H	H	O-Nh	H	H	OMe	金柑苷 Acacetin7-O-neohesperidoside	7-O-UGT and 1,2RhaT
	5							3,5 - 双碳 - $\beta$ -D - 吡喃葡萄糖 基根皮素 3',5'-di-C- $\beta$ - Glucopyranosylphloretin	C-UGT
									
	7	O-Nh	H	OH				柚皮苷 Naringenin-7-O-neohesperidoside	7-O-UGT and 1,2RhaT
	11	O-Nh	H	OMe				枸橼苷 Isosakuranetin7-O-neohesperidoside	7-O-UGT and 1,2RhaT

注: Nh 代表新橙皮糖苷。  
Note: Nh represents Neohesperidose.

2.2 浏阳金柑果实转录组测序质量评估及组装

已有的研究报道表明, 植物 UGT 通常在植物体基因组内组成一个大的基因家族, 例如拟南芥基因组中有 107 个、苹果中有 254 个、玉米中有 148 个、葡萄中有 184 个 UGT 基因。通过高通量测序将高表达的 UGT 基因筛选出来, 随后对其中的目的基因进行鉴定。

本试验采集浏阳金柑不同发育时期的果实进行转录组测序, 进而筛选目的 UGT 基因。转录组测序单个文库产生 70 439 666 ~ 93 922 318 Raw reads (表 4)。将原始测序数据过滤, 去除测序接头污染、冗余重复等低质量的 Raw reads 后, 单个文库获得高质量 (Phred 数值大于 Q30) 的 Clean reads 数量为 68 062 746 ~ 82 251 544。

表 4 转录组测序数据统计  
Table 4 RNAseq data statistics

花后天数 Days after flowering	样品 Sample	Raw read 数量 Number of raw reads	Raw 数据量 Raw bases	Clean read 数量 Number of clean reads	Clean 数据量 Clean bases
15	果实 Fruit	85 146 060	12 857 055 060	82 240 654	12 193 317 104
31	果实 Fruit	80 187 236	12 108 272 636	75 135 958	11 157 121 299
69	果皮 Peel	84 567 414	12 769 679 514	77 337 200	11 477 420 040
	果肉 Pulp	81 810 410	12 158 009 821	70 468 232	10 640 703 032
99	果皮 Peel	70 439 666	10 636 389 566	68 062 746	10 088 051 918
	果肉 Pulp	93 922 318	14 182 270 018	68 155 716	10 097 506 715
130	果皮 Peel	91 056 208	13 498 221 015	82 251 544	12 419 983 144
	果肉 Pulp	81 454 538	12 299 635 238	79 594 824	11 820 402 239
156	果皮 Peel	88 092 724	13 302 001 324	78 692 596	11 682 673 452
	果肉 Pulp	85 165 926	12 661 499 166	77 943 822	11 769 517 122

注：花后 15 和 31d 的样品果皮和果肉不分离。  
Note: The peel and pulp of sample are not separated on 15 and 31 days after flowering.

以克莱门氏小柑橘（*Citrus clementina*）的基因组为参考，对转录组数据进行分析。将高质量的 Clean reads 比对到克莱门氏小柑橘基因组，比对率大约为 79.52% ~ 84.16%。将比对到基因组的 Clean reads 进一步组装成 21 524 个基因，并采用 Cuffnorm 软件对这些基因的 FPKM 表达量进行计算。删除在所有时期和组织中 FPKM 表达量都小于 10 的基因之后，共获得 11 350 个高表达基因。利用克莱门氏小柑橘蛋白数据库对上述 11 350 个基因进行注释。在注释的所有基因中发现 86 个潜在的 UGT 编码基因。通过在线软件 PROSITE profiling 对这些 UGT 编码蛋白进行 Pfam domains（PS00375）检查，PS00375 代表植物次生代谢产物糖基转移酶（Plant Secondary Product Glycosyltransferase, PSPG）基序（Motif）。该基序长度为 44 ~ 48 aa，位于 UGT 蛋白序列的 C - 端。在 UGT 催化类黄酮糖基化修饰过程中，PSPG 主要负责结合 UDP - 糖。最终筛选到 49 个高表达的 UGT 基因（暂时命名为 *FcUGT1* ~ *FcUGT49*）。

2.3 UGT 基因的鉴定及其功能预测

以筛选到的 49 个 UGT 基因和 39 个功能已知 UGT 基因的编码蛋白序列构建进化树（图 2）。基于聚类关系及聚类中是否包含功能已知蛋白，将 49 个 FcUGT 中的 28 个划分到 6 个功能聚类群（Cluster I ~ VI）。结合‘浏阳金柑’果实中类黄酮糖元的种类及结构（见 2.1），发现 3 个聚类（Cluster III、Cluster V 及 Cluster VI）中的 13 个 FcUGT 可能参与了金柑类黄酮的修饰过程。Cluster III 中仅包含 1 个功能已知的 UGT（OsCGT），能够催化葡萄糖基以 C-C 糖苷键连接到类黄酮苷元分子上，因此，将与之聚在一起的 FcUGT48 界定为 C-UGT。Cluster V 中包含 8 个功能已知的 UGT，主要催化类黄酮 7-OH 位的糖基化修饰，因此，将能够与它们聚类的 9 个 FcUGT 界定为 7-O-UGT，其有可能催化 UDP - 葡萄糖的葡萄糖基以 O-C 键的形式连接到类黄酮苷元分子 7-OH 位上。Cluster VI 中包含 8 个功能已知的 UGT，主要以类黄酮单糖苷为底物，催化类黄酮新橙皮糖苷，因此将与之聚类的 3 个 FcUGT 界定为 1,2RhaT。

其他 3 个聚类中，Cluster I 包含 2 个 FcUGT 和 5 个功能已知的 UGT，功能已知的 UGT 主要催化类黄酮 5-OH 位的糖基化修饰；Cluster II 中包含 1 个 FcUGT 和 10 个功能已知的 UGT，这些 UGT 主要催化类黄酮 3-OH 位的糖基化修饰；Cluster IV 中包含 12 个 FcUGT 和 6 个功能已知的 UGT，这些 UGT 通常催化类黄酮多个羟基化位点的糖基化修饰。

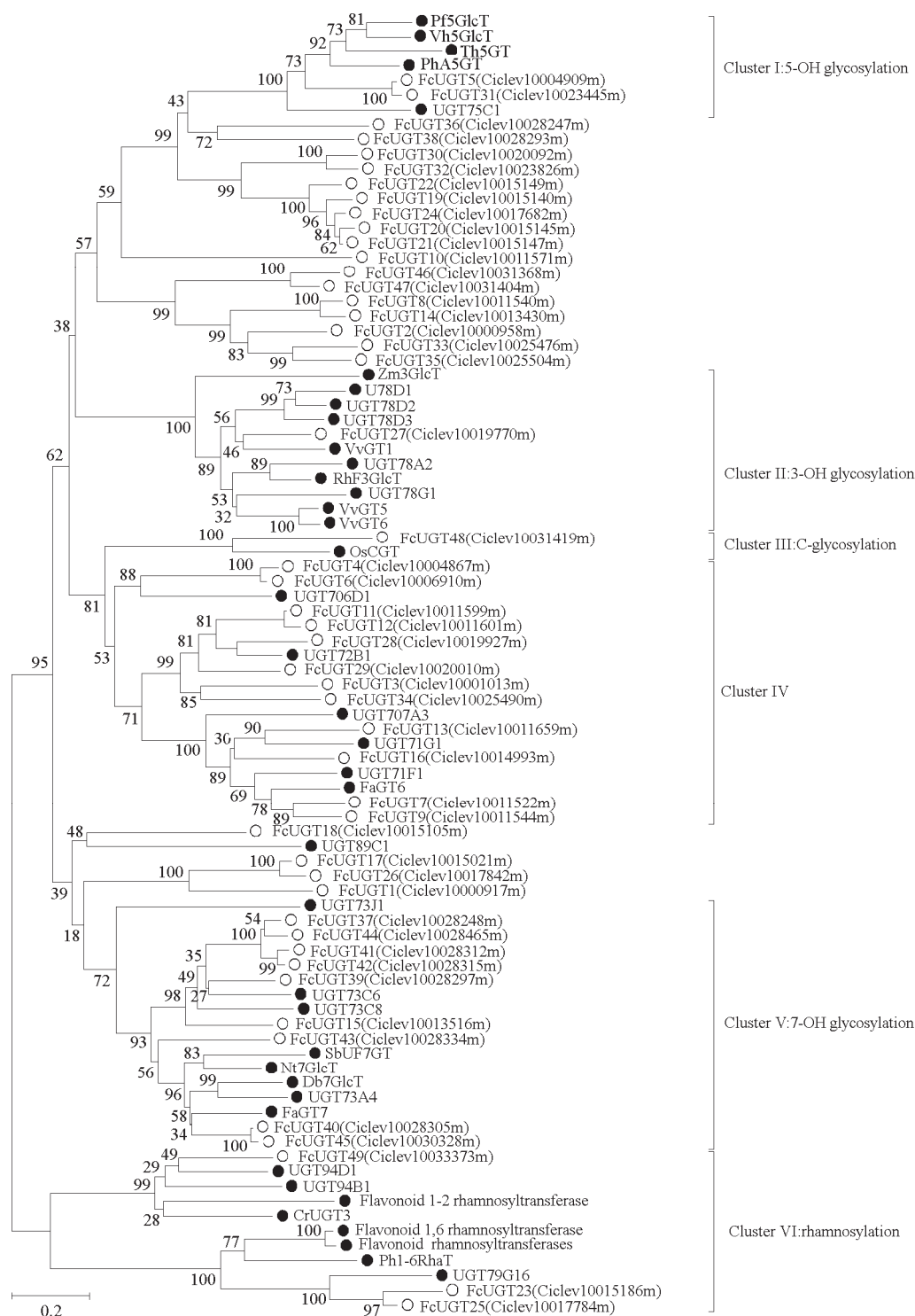


图 2 基于 49 个 *FcUGT* 基因和 39 个功能已知 UGT 基因的编码蛋白构建进化树

实心圆代表功能已知 UGT, 基因名来自数据库 NCBI 或 Uniprot; 空心圆代表金柑的 UGT, 其括弧中  
克莱门氏小柑橘基因名来源于 Phyzome 数据库。

Fig. 2 Phylogenetic relationship based on proteins of 49 *FcUGTs* and 39 functionally characterized UGTs

Solid circles represent functionally characterized UGTs from NCBI or Uniprot, and hollow ones mean *FcUGTs*, followed by  
*C. clementina* UGTs in brackets from Phyzome.



2.4 浏阳金柑果实发育过程中 *FcUGT* 基因表达模式

根据转录组数据 FPKM 值，对 49 个 *FcUGT* 基因的表达趋势以热图（图 3）的形式进行分析。总体上，49 个基因可分为两种表达模式：在果皮中，第 1 种模式（Cluster I）包含 24 个基因，在“花后 99 d”之前有更高的表达量；第 2 种模式（Cluster II）包含 25 个基因，在“花后 99 d”之后有更高的表达量。相较于果皮，49 个基因中的大部分在果肉中呈现一个低表达模式。

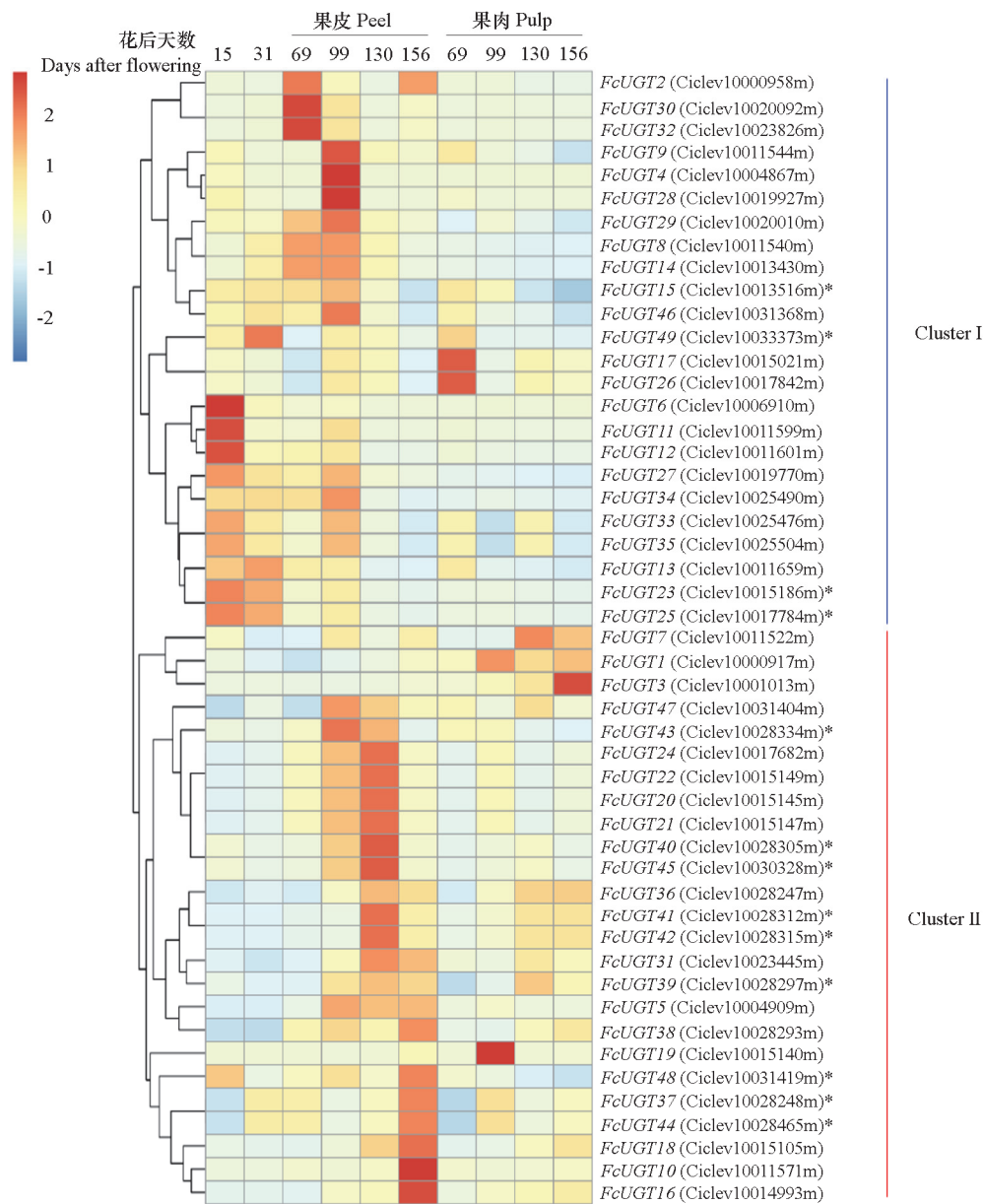


图 3 浏阳金柑果实中 49 个 *FcUGT* 基因表达热图

蓝色代表低表达，红色代表高表达；\*代表13个高表达的金柑类黄酮糖基转移酶基因。

Fig. 3 Expression profiles of 49 *FcUGT* genes in kumquats fruit

Blue indicates low expression and red indicates high expression; \* represents 13 highly expressed *FcUGT*s.

转录组在测序、组装及注释过程中, 分析的基因比较多, 加之植物基因组中 UGT 基因家族成员众多且核苷酸序列存在一定的相似性, 定量分析上可能存在误差。基于进化聚类关系 (图 2), 发现 cluster III、V 和 VI 中的 *FcUGT* 基因可能参与了金柑类黄酮的修饰过程。从这 3 个聚类中随机选择 6 个基因, 以浏阳金柑不同发育时期果实为材料, 对上述转录组数据进行 qRT-PCR 验证。结果显示, 6 个 *FcUGT* 基因在果实中存在高表达 (图 4), 且其表达模式与转录组热图结果大致相符, 说明转录组所得 FPKM 值相对准确。

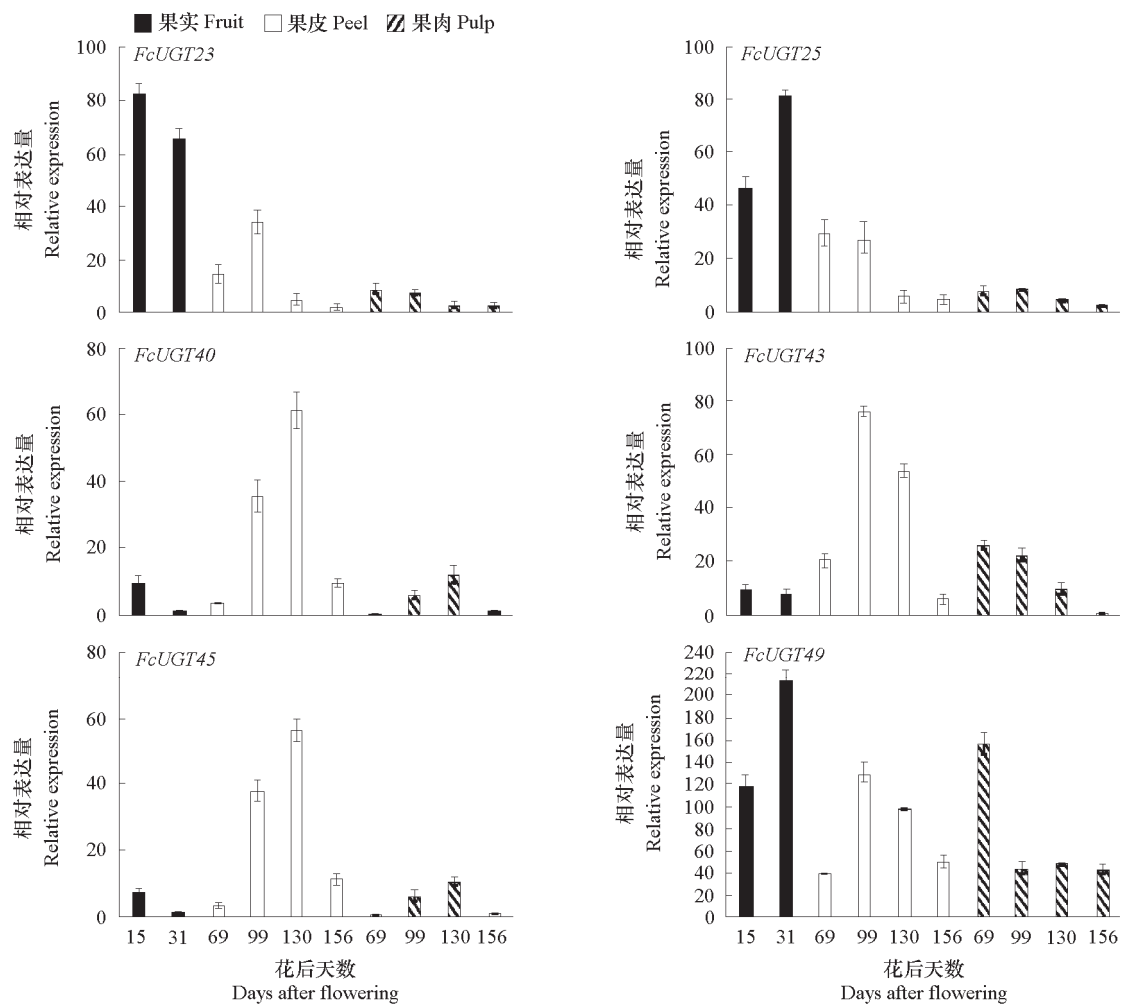


图 4 浏阳金柑果实中 6 个 *FcUGT* 基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression abundance of 6 *FcUGT* genes in kumquant fruit

### 3 讨论

金柑属于柑橘近缘属植物, 风味独特、香味浓郁、营养价值高, 在食品、医药保健中的作用已受到广泛关注。但截至目前为止, 金柑类黄酮的研究主要以含量检测为主, 对类黄酮合成机制方面的研究较少。生物类黄酮在金柑中多以糖苷形式存在, 且以黄烷酮 - O - 糖苷类、黄酮 - O - 糖苷类和黄酮 - C - 糖苷类含量最为丰富 (Barreca et al., 2011; Lou et al., 2015)。本试验通过 UPLC G2-S

QTOF 分析检测, 鉴定出了 11 种类黄酮。基于类黄酮糖苷的结构和种类, 将其划分为 3 种, 第 1 种为 *C*-葡萄糖苷类黄酮, 包括维采宁-2、3,5-双碳- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖基根皮素; 第 2 种为 *C*-新橙皮糖苷类黄酮, 包括木犀草素-8-*C*-新橙皮糖苷、木犀草素-6-*C*-新橙皮糖苷、芹菜素-8-*C*-新橙皮糖苷、刺槐黄素-8-*C*-新橙皮糖苷、刺槐黄素-6-*C*-新橙皮糖苷; 第 3 种为 *O*-新橙皮糖苷类黄酮, 包括野漆树苷、柚皮苷、金柑苷、枸橼苷。

*C*-葡萄糖苷类黄酮主要由 *C*-UGT 催化完成, 将 UDP-葡萄糖的葡萄糖基以 C-C 键的形式连接到类黄酮苷元分子上, 该基因已从金柑和其他的作物中提取并进行了功能鉴定 (Brazier-Hicks et al., 2009; Nagatomo et al., 2014; Hirade et al., 2015; Ito et al., 2017)。*C*-新橙皮糖苷类黄酮的糖基化过程, 需要经过两步的糖基化修饰, 第 1 个糖基化反应通常由 *C*-UGT 催化, 第 2 个糖基化反应是以第一步的产物 *C*-葡萄糖苷类黄酮为底物, 由 1,2RhaT 催化将 UDP-鼠李糖的鼠李糖基团转移至类黄酮 *C*-葡萄糖的葡萄糖残基上, 形成 *C*-新橙皮糖苷。*O*-新橙皮糖苷类黄酮的糖基化过程, 同样需要经过两个连续的糖基化反应。第 1 个糖基化反应通常由 7-*O*-UGT 催化, 将葡萄糖残基从 UDP-葡萄糖转移至类黄酮苷元的 7-OH 位置, 形成 7-*O*-葡萄糖苷类黄酮; 随后, 1,2RhaT 催化鼠李糖残基从 UDP-鼠李糖转移至类黄酮 7-*O*-葡萄糖的葡萄糖残基上, 形成类黄酮 7-*O*-新橙皮糖苷 (Lewinsohn et al., 1989; Frydman et al., 2004)。上述 3 类基因中, *C*-UGT 在金柑中已有报道, 而柑橘属中报道的 1,2RhaT, 能够以 *O*-葡萄糖类黄酮为底物, 但对于是否能够以 *C*-葡萄糖类黄酮为底物, 催化形成 *C*-新橙皮糖苷类黄酮尚不清楚。

通过转录组测序分析, 筛选了 49 个在金柑果实中高表达的 *FcUGT* 基因, 其中 12 个 *FcUGT* 基因的编码蛋白可能参与了金柑类黄酮糖基化修饰。进化树第 5 类群中的 9 个 UGT, 编码 7-*O*-UGT, 可能参与了 *O*-新橙皮糖苷类黄酮的修饰过程, 而第 6 类群中的 3 个 UGT, 编码 1,2RhaT, 可能参与了 *O*-或 *C*-新橙皮糖苷类黄酮的修饰过程。考虑到转录组测序、注释及定量分析基因过程中可能产生误差, 进一步对 12 个基因中的 6 个进行了 qPCR 分析。结果显示, 6 个 *FcUGT* 基因的 qPCR 表达模式与转录组热图大致相符, 表明转录组的定量分析较为准确, 12 个高表达 UGT 基因可以作为候选基因进行下一步功能分析。

综上所述, 本研究中首先通过 UPLC G2-S QTOF 鉴定浏阳金柑果实中类黄酮的种类, 并分析了糖元种类及其与苷元的连接方式; 随后, 基于转录组测序从 UGT 基因家族中筛选到 49 个高表达 *FcUGT* 基因; 最后, 采用进化功能聚类的方式, 结合浏阳金柑果实类黄酮的种类, 将基因数量进一步缩小至 12 个 *FcUGT* 基因, 为进一步的功能鉴定等研究提供了一定的基础。

## References

- Abad-García B, Garmón-Lobato S, Sánchez-Ilárduya M B, Berrueta L A, Gallo B, Vicente F, Alonso-Salces R M. 2014. Polyphenolic contents in citrus fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technology*, 238 (5): 803 - 818.
- Barreca D, Bellocchio E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. 2011. Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food Research International*, 44: 2190 - 2197.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E K, Poppenberger B. 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (3): 254 - 263.
- Brazier-Hicks M, Evans K M, Gershtater M C, Puschmann H, Steel P G, Edwards R. 2009. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (27): 17926 - 17934.
- Brugliera F, Holton T A, Stevenson T W, Farcy E, Lu C Y, Cornish E C. 1994. Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the Rt locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 5 (1): 81 - 92.

- Cao Yunlin, Xing Mengyun, Xu Changjie, Li Xian. 2018. Biosynthesis of flavonol and its regulation in plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (1): 177 – 192. (in Chinese)
- 曹运琳, 邢梦云, 徐昌杰, 李 鲜. 2018. 植物黄酮醇生物合成及其调控研究进展. *园艺学报*, 45 (1): 177 – 192.
- Caputi L, Malnoy M, Goremykin V, Nikiforova S, Martens S. 2012. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyl transferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *The Plant Journal*, 69 (6): 1030 – 1042.
- Chen Jia-jing, Peng Zhao-xin, Shi Mei-yan, Xu Juan. 2016. Advances in on flavonoid composition and metabolism in *Citrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (2): 384 – 400. (in Chinese)
- 陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 徐 娟. 2016. 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展. *园艺学报*, 43 (2): 384 – 400.
- Frydman A, Weissshauss O, Bar-Peled M, Huhman D V, Sumner L W, Marin F R, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J, Eyal Y. 2004. Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2-rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *The Plant Journal*, 40 (1): 88 – 100.
- Gachon C M, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P. 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, 10 (11): 542 – 549.
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12 (8): 1641 – 1673.
- Hirade Y, Kotoku N, Terasaka K, Saijo-Hamano Y, Fukumoto A, Mizukami H. 2015. Identification and functional analysis of 2-hydroxyflavanone C-glucosyltransferase in soybean (*Glycine max*). *FEBS Lett*, 589 (15): 1778 – 1786.
- Ito T, Fujimoto S, Suito F, Shimosaka M, Taguchi G. 2017. C-glycosyltransferases catalyzing the formation of di-C-glucosyl flavonoids in citrus plants. *The Plant Journal*, 91 (2): 187 – 198.
- Joe E J, Kim B G, An B C, Chong Y, Ahn J H. 2010. Engineering of flavonoid O-methyltransferase for a novel regioselectivity. *Molecules & Cells*, 30 (2): 137 – 141.
- Jones P, Messner B, Nakajima J, Schaffner A R, Saito K. 2003. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (45): 43910 – 43918.
- Kubo H, Nawa N, Lupsea S A. 2007. Anthocyanin less1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a UDP-glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase. *Journal of Plant Research*, 120 (3): 445 – 449.
- Lewinsohn E, Berman E, Mazur Y, Gressel J. 1989. (7)-Glucosylation and (1-6)-rhamnosylation of exogenous flavanones by undifferentiated *Citrus* cell cultures. *Plant Science*, 61: 23 – 28.
- Lim E K, Bowles D J. 2004. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO Journal*, 23 (15): 2915 – 2922.
- Lou S N, Lai Y C, Huang J D, Ho C T, Ferng L H, Chang Y C. 2015. Drying effect on flavonoid composition and antioxidant activity of immature kumquat. *Food Chemistry*, 171: 356 – 363.
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal*, 1 (1): 37 – 49.
- Masada S, Terasaka K, Oguchi Y, Okazaki S, Mizushima T, Mizukami H. 2009. Functional and structural characterization of a flavonoid glucoside 1,6-glucosyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Physiology*, 50 (8): 1401 – 1415.
- Moehs C P, Allen P V, Friedman M, Belknap W R. 1997. Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *The Plant Journal*, 11 (2): 227 – 236.
- Nagatomo Y, Usui S, Ito T, Kato A, Shimosaka M and Taguchi G. 2014. Purification, molecular cloning and functional characterization of flavonoid C-glucosyltransferases from *Fagopyrum esculentum* M. (buckwheat) cotyledon. *The Plant Journal*, 80 (3): 437 – 448.
- Ogawa K, Kawasaki A, Omura M, Yoshida T, Ikoma Y, Yano M. 2001. 3',5'-Di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, 57: 737 – 742.
- Paquette S, Møller B L, Bak S. 2003. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 62 (3): 399 – 413.
- Ralston E J, English J J, Dooner H K. 1988. Sequence of three bronze alleles of maize and correlation with the genetic fine structure. *Genetics*, 119 (1): 185 – 197.
- Shu Qingyan, Zhu Jin, Men Siqi, Hao Qing, Wang Qianyu, Liu Zheng'an, Zeng Xiuli, Wang Liangsheng. 2018. Establishing virus induced gene

- silencing (VIGS) system in tree peony using *PsUGT* genes. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (1): 168 – 176. (in Chinese)
- 舒庆艳, 朱 瑾, 门思琦, 郝 青, 王倩玉, 刘政安, 曾秀丽, 王亮生. 2018. 基于牡丹类黄酮糖基转移酶基因建立 VIGS 技术体系. *园艺学报*, 2018, 45 (1): 168 – 176.
- Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Fujiwara H, Ashikari T, Kusumi T. 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiology*, 37 (5): 711 – 716.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai M Y, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe D B, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 42 (2): 218 – 235.
- Wise R P, Rohde W, Salamini F. 1990. Nucleotide sequence of the Bronze-1 homologous gene from *Hordeum vulgare*. *Plant Molecular Biology*, 14 (2): 277 – 279.
- Yamazaki M, Gong Z, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Saito K. 1999. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *The Journal of Biology Chemistry*, 274 (11): 7405 – 7411.
- Yonekura-Sakakibara K, Fukushima A, Nakabayashi R, Hanada K, Matsuda F, Sugawara S, Inoue E, Kuromori T, Ito T, Shinozaki K, Wangwattana B, Yamazaki M, Saito K. 2012. Two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification delineated by transcriptome independent component analysis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 69 (1): 154 – 167.
- Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Sugawara S, Tohge T, Ito T, Koyanagi M, Kitajima M, Takayama H, Saito K. 2014. A flavonoid 3-*O*-glucoside: 2"-*O*-glucosyltransferase responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79 (5): 769 – 782.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K. 2008. Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (8): 2160 – 2176.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Niida R, Saito K. 2007. Identification of a flavonol 7-*O*-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (20): 14932 – 14941.