

盾叶薯蓣须根响应低磷胁迫的GC-MS代谢产物及基因表达特征分析

谢彩侠¹, 崔锦鹏¹, 李雅静¹, 张娟¹, 刘庆普¹, 龚海燕¹, 雷敬卫¹, 王丰青^{2*}
(1. 河南中医药大学药学院, 河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 郑州 450046;
2. 河南农业大学, 郑州 450032)

[摘要] 目的:探讨盾叶薯蓣须根在低磷胁迫下的代谢产物及基因表达特征。方法:设置重度胁迫组、中度胁迫组与正常组模拟盾叶薯蓣低磷胁迫实验,在胁迫初期采取盾叶薯蓣须根,分别利用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)衍生化及RNA-seq技术对其代谢产物和转录组特征进行分析,通过对不同处理代谢产物的多元统计分析、差异表达基因的功能分析及数据挖掘,筛选低磷胁迫下盾叶薯蓣须根产生的代谢标志物,分析差异表达基因的代谢通路特征。结果:从盾叶薯蓣须根中共检测到116个GC-MS代谢产物,不同低磷处理下盾叶薯蓣须根的代谢特征存在明显差异,利用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型从不同处理须根的代谢产物中筛选到6个差异代谢物,主要为糖类、醇类等成分,这些物质可能是盾叶薯蓣须根响应低磷胁迫的代谢标志物;重度胁迫组与正常组中筛选到的差异基因主要富集到过氧化物酶途径、磷酸盐和次磷酸盐代谢途径,重度胁迫组与中度胁迫组中筛选到的差异基因主要富集到谷胱甘肽代谢途径及磷酸戊糖途径;从须根中筛选出177个潜在响应低磷胁迫的差异基因,涉及萜类骨架、肌醇生物合成等多个途径,这与盾叶薯蓣须根部位响应低磷胁迫的代谢差异物多为糖类与肌醇等物质相吻合。结论:低磷胁迫下盾叶薯蓣须根部位的代谢产物及基因表达均发生了相应的应答,差异代谢物与差异表达基因具有密切的关系,该研究为盾叶薯蓣响应低磷胁迫的分子机制提供理论依据。

[关键词] 盾叶薯蓣; 低磷胁迫; 气相色谱-质谱联用技术(GC-MS); RNA-seq; 差异代谢物; 差异基因

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0189-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220719 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220329.1154.005.html>

[网络出版日期] 2022-03-29 17:49

GC-MS Metabolites and Gene Expression Characteristics in Fibrous Roots of *Dioscorea zingiberensis* in Response to Low Phosphorus Stress

XIE Caixia¹, CUI Jinpeng¹, LI Yajing¹, ZHANG Juan¹, LIU Qingpu¹,
GONG Haiyan¹, LEI Jingwei¹, WANG Fengqing^{2*}

(1. Henan Provincial Engineering Technology Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the metabolites and gene expression characteristics in fibrous roots of *Dioscorea zingiberensis* in response to low phosphorus stress. **Method:** The severe stress group, the moderate stress group, and the normal group were set up to stimulate the low phosphorus stress experiment. The fibrous roots of *D. zingiberensis* were collected during initial stress. The metabolites and transcriptomic characteristics were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) derivatization and RNA-seq

[收稿日期] 2021-12-14

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(20A360016)

[第一作者] 谢彩侠, 博士, 教授, 从事中药质量控制研究, E-mail: nanyang.xcx@163.com

[通信作者] * 王丰青, 博士, 副教授, 从事中药资源可持续利用研究, E-mail: nanyangxcx@126.com

techniques. Through multivariate statistical analysis of metabolites treated by different methods, functional analysis of differentially expressed genes, and data mining, the metabolism markers produced in fibrous roots of *D. zingiberensis* under low phosphorus stress were screened out, and the metabolic pathway characteristics of different genes were analyzed. **Result:** A total of 116 GC-MS metabolites were detected from the fibrous roots of *D. zingiberensis*. The metabolic characteristics of fibrous roots of *D. zingiberensis* under different low phosphorus treatments were obviously different. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) model was used to screen six differential metabolites represented by sugars and alcohols from metabolites of fibrous roots treated with different methods, and these components were presumedly metabolism markers of fibrous roots of *D. zingiberensis* in response to low phosphorus stress. The differential genes screened out from the severe stress group and the normal group were mainly enriched in peroxidase pathway, phosphate and hypophosphate metabolism pathway, while the differential genes screened out from the severe stress group and the moderate stress group were mainly enriched in glutathione metabolism pathway and phosphopentose pathway. A total of 177 differential genes in response to low phosphorus stress were screened out from fibrous roots, involving many pathways such as terpenoid skeleton and inositol biosynthesis, which was consistent with the fact that the metabolic differential components in fibrous roots in response to low phosphorus stress were mainly saccharides and inositol. **Conclusion:** The metabolites and gene expression in fibrous roots of *D. zingiberensis* responded to low phosphorus stress, and the differential metabolites were closely related to differentially expressed genes. This study is expected to provide a theoretical basis for the research on the molecular mechanism of *D. zingiberensis* in response to low phosphorus stress.

[Keywords] *Dioscorea zingiberensis*; low phosphorus stress; gas chromatography mass spectrometry (GC-MS); RNA-seq; differential metabolites; differential genes

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* 为薯蓣科薯蓣属植物,俗称黄姜、火头根等,根茎中含有大量的甾体皂苷类成分,是提取薯蓣皂素重要的药源植物和治疗心脑血管疾病^[1]的临床用药。由于药材需求量大,目前盾叶薯蓣已实现了大面积栽培,全国有10多个省市60多个县市在发展盾叶薯蓣产业,基地面积已逾10多万公顷^[2]。由于影响盾叶薯蓣质量的因素较多^[3],药农又缺乏科学的管理指导盾叶薯蓣种植,长期以来只种不养,导致盾叶薯蓣根茎腐烂、产量和甾体皂苷含量下降,严重制约了盾叶薯蓣规范化安全生产和区域经济的健康发展。

磷是维持作物生长所必需的第2大矿质元素,对作物的生长发育具有重要的作用。作物能直接从土壤中吸收利用的磷称之为土壤“有效磷”,只占土壤全磷的很少一部分,而大部分磷是以化合态的形式被土壤固定^[4-5],难以被作物直接吸收利用,这就造成了所谓的“遗传学缺磷”,并且已成为目前许多地区作物增产的重要限制性因子。虽然可以通过施用磷肥来解决土壤有效磷缺乏的问题,但是,磷矿资源的有限性严重制约了磷肥的生产,而且,磷肥的大量施用还会导致严重的农田磷素流失和水体富营养化现象^[6]。更重要的是,施入的磷肥有

80%以上被土壤中的Al、Fe和Ca等金属离子固定成难溶性化合物,变成作物不能利用的形式累积在土壤中^[7],这就造成大多数农田土壤全磷含量很高,而有效磷含量很低。因此低磷胁迫下如何提高植物对生长环境中磷的吸收关系到土壤中磷资源的可持续利用。课题组通过前期的生产实践及研究结果发现,长期种植盾叶薯蓣后会降低土壤有效磷含量,引起低磷胁迫,导致盾叶薯蓣植株生长发育受阻。植物在生物或非生物逆境下会通过合成各类代谢物质来提高对逆境的耐受或适应能力,并最终实现植物所特有的繁殖和种群扩张策略^[8],而合成的代谢产物是基因表达的最终产物,也是生物体呈现外部表型差异的物质基础,因此,分析低磷胁迫下的代谢组及基因表达特征是揭示盾叶薯蓣对低磷胁迫应答机制的重要内容。目前,植物代谢组学主要采用气相色谱质谱联用技术(GC-MS)和核磁共振技术(NMR)平台,其中,NMR具有样品前处理操作简单、较高的重现性和检测客观性等优点^[9],但GC-MS却拥有较高的分辨率和灵敏度,适合具有复杂代谢产物的生物体^[10],尤其适合植物代谢物分析检测。前期研究发现,低磷胁迫初期,盾叶薯蓣的须根形态发生了明显变化,为了进一步分析低磷

胁迫下盾叶薯蓣须根的代谢产物及基因表达特征,本研究利用GC-MS技术及RNA-seq对低磷胁迫初期不同处理盾叶薯蓣的须根进行代谢产物及转录组特征分析,由于盾叶薯蓣不同组织中主要含有强极性难挥发的化合物,因此实验采用硅烷化衍生化法取代强极性基团,对盾叶薯蓣整体小分子代谢物质进行分析,并应用多元统计学方法挖掘盾叶薯蓣响应低磷胁迫的主要代谢物质,为盾叶薯蓣响应低磷胁迫的分子机制研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 7890A-7000B型气质联用仪(美国安捷伦公司),DB-5MS型毛细管柱(250 μm ×30 m,0.1 μm);*N*-甲基-*N*-三甲基硅烷三氟乙酰胺(MSTFA,上海伊卡生物科技有限公司,批号EK180512),核糖醇(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB170227);盐酸甲氧胺(上海源叶生物科技有限公司,批号O14O17X22868);MiniBEST试剂盒(日本Takara公司);三氯甲烷、霍格兰营养液等均为分析纯。

1.2 低磷胁迫实验样品获取^[11] 以珍珠岩、蛭石(3:1)作为培养基质,进行盆栽试验。试验设计为正常供磷(N)组、中度低磷胁迫(H)组、重度低磷胁迫(Z)组3个处理,每个处理设置重复10次。正常供磷以霍格兰完全营养液进行浇灌,中度处理组与重度处理组分别浇灌中度缺磷营养液(完全营养液中一半的磷含量)与重度缺磷营养液(剔除磷组分的完全营养液,剔除的K用KCl进行补充)。选取大小一致已有芽点的种根,栽种于不同磷处理的盆栽基质中,统一管理。在苗龄30 d的胁迫初期(5月30号,标记为5)采集盾叶薯蓣须根(FR)后,清洗,用吸水纸吸干,后快速用锡箔纸包装,置于液氮快速冷冻后放于-80℃冰箱保存备用。Z、H及N组处理的样品分别标记为FR_Z_5、FR_H_5和FR_N_5。

2 方法

2.1 GC-MS样品提取与衍生化^[12] 取保存在-80℃冰箱中的盾叶薯蓣须根,置于研钵中,用液氮冷冻充分研磨后,称取0.1 g,放入2 mL离心管中,加入甲醇1.4 mL,置于-20℃冰箱中保存。实验时,取出并加入质量浓度为0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的核糖醇(溶解于纯净水,作为极性成分的内标)60 μL ,涡旋15 s,将离心管70℃恒温15 min,混匀后放入冷冻微量离心机中,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径8.5 cm)。将上清液转移到1个新的10 mL离心管中,加入三氯甲烷(-20℃冰箱中保存)750 μL 和纯

净水(4℃)1.5 mL,混匀,使极性相与非极性相充分溶于水 and 三氯甲烷中。之后置离心机中12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液(极性相)100 μL 放入1.5 mL离心管中并减压干燥;向离心管中加入盐酸甲氧胺(20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,溶于吡啶中)60 μL ,37℃振荡2 h。之后将MSTFA 100 μL 加入到样品中,37℃振荡60 min后,移至GC样品瓶中待测。

2.2 GC-MS条件^[12] DB-5MS毛细管气相色谱柱(250 μm ×30 m,0.1 μm),载气为氦气(99.999%),流速1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流比5:1,进样量1 μL ,程序升温(70℃保持5 min,3℃ $\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至166℃,1℃ $\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至175℃,10℃ $\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至280℃,保持3.5 min)。质谱条件:离子源电子轰击(EI),电子能量70 eV,传输线温度270℃,离子源温度230℃,扫描速度0.6 $\text{scan}\cdot\text{s}^{-1}$,溶剂延迟时间为4 min, m/z 45~500。

2.3 GC-MS数据预处理及统计学分析 经Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis软件以峰面积比大于0.001为标准对峰进行过滤,以峰谷间连线为基线对峰进行积分,导出Excel格式文件,依照保留时间进行峰对齐,将数据进行内标归一化处理。并利用SIMCA 14.1统计软件对归一化后的数据进行多元统计分析,首先进行主成分分析(PCA)与层次聚类分析(HCA),观察组间差异;为了进一步分析组间差异,利用Pareto标度化预处理进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),输出得分图、置换检验图,并输出变量重要性(VIP)>1的物质利用 T -tests检验计算 P ,仅当物质满足VIP>1且 $P<0.05$ 时认为其为差异代谢物具有统计学意义。

2.4 转录组测序及组装 将各处理下盾叶薯蓣植株的须根样品分别混和均匀,各制备1份转录组测序样品,然后以MiniBEST试剂盒进行柱式法提取各处理盾叶薯蓣须根总RNA。以NanoDrop和Agilent2100检测总RNA的完整性和浓度。利用提取样品总RNA构建文库。构建好的文库用Agilent 2100 Bioanalyzer和ABI Step One Plus实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)System进行质量和产量检测,文库质控合格后进行测序。用带有OligodT的磁珠富集有polyA尾巴的mRNA,用DNA探针杂交rRNA,RNaseH选择性消化DNA/RNA杂交链,再用DNaseI消化掉DNA探针,纯化后即得到所需RNA。用打断buffer把获得的RNA片段化,随机的N6引物进行反转录,再合成cDNA二链形成双链DNA;把合成的双链DNA末端补平

并5'端磷酸化,3'端形成突出一个“A”的黏末端,再连接一个3'端有凸出“T”的鼓泡状的接头;连接产物通过特异的引物进行PCR扩增;PCR产物热变性成单链,再用一段桥式引物将单链DNA环化得到单链环状DNA文库,上机测序。由测序所得的数据称为raw reads或raw data,随后使用软件SOAPnuke对raw reads进行过滤,得到clean Reads。使用Trinity对clean reads进行组装,然后使用Tgic1对转录本进行聚类去冗余得到Unigene,再使用Tgic1对每个样品的Unigene再进行一次聚类去冗余得到最终的Unigene用于后续分析,命名为“All-Unigene”。后通过Blast比对SwissProt和Hmmscan搜索Pfam蛋白同源序列,从而预测编码区域。

2.5 基因表达量分析 使用Bowtie2将clean reads比对到组装好的转录组序列上,然后使用RSEM计算各个样品的转录本表达水平,用FPKM表示。具体计算公式 $FPKM=10^6C/NL/10^3$ 。FPKM(A)为基因A的表达量,则C为唯一比对到基因A的fragments数,N为唯一比对到参考基因的总fragments数,L为基因A编码区的碱基数。

2.6 差异基因筛选及京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能分析 参照AUDIC等^[13]发表在Genome Research上的基于测序的差异基因检测方法,根据基因的表达量(FPKM值)计算该基因在不同样本间的差异表达倍数。在分析中,差异表达基因默认定义为错误发现率(FDR)≤0.05且倍数差异在2倍以上的基因^[14],并对差异基因进行pathway代谢通路定位分析。

2.7 盾叶薯蓣须根响应低磷胁迫潜在关键酶基因的候选 在Z组与N组、Z组与H组两组对比的差异基因显著富集的前20个代谢通路中,根据其共有代谢通路与其他相关代谢通路中差异基因互作网络找到有互作关系的基因,根据其基因注释信息且在参考文献的基础上候选为盾叶薯蓣响应低磷胁迫潜在的基因。

3 结果与分析

3.1 低磷胁迫下盾叶薯蓣须根GC-MS代谢产物分析 利用GC-MS对衍生化后的盾叶薯蓣须根样品进行检测分析,获取总离子流图见图1,得到116个化合物,参照内标的峰面积进行归一化处理,见增强出版附加材料。

3.1.1 低磷胁迫下盾叶薯蓣须根GC-MS代谢产物PCA与HCA 首先对盾叶薯蓣须根GC-MS代谢产物归一化后的数据进行降维分析,建立无监督的

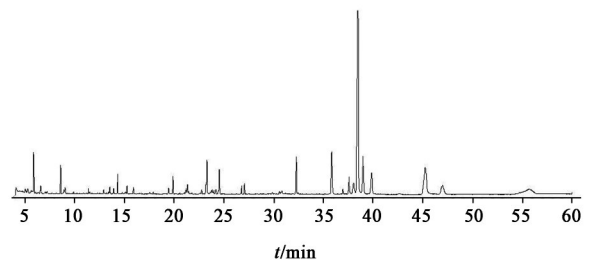


图1 盾叶薯蓣须根GC-MS总离子流

Fig. 1 GC-MS total ion flow diagram of fibrous roots of *Dioscorea zingiberensis*

PCA模型,利用Outlier剔除异常样本,并基于Ward算法对根茎样品进行聚类分析HCA,见图2。PCA得分图中每个点代表1个根茎样品,椭圆为95%的置信区间。由结果可知,N组聚为一类,Z组与H组相互交叉,距离N组较远;由HCA分析结果可看出,当样品间距离>32.992 N组聚为一类,然而Z组与H组相互聚在一起,直到距离>304.117 Z组与H组聚成一类,整体与N组分为两类。综上显示PCA分析结果与HCA分析结果一致,表明N组与另外两组差异较大,Z组与H组差异较小。

3.1.2 低磷胁迫下盾叶薯蓣须根GC-MS代谢产物的OPLS-DA分析 为了进一步排除组内对组间差异的干扰,分别对Z组与N组、Z组与H组进行OPLS-DA分析见图3、图4。由散点图结果可知,Z组与N组、Z组与H组差异均明显,各自分布在两个象限;置换检验结果显示置换后的 R^2 、 Q^2 值均高于原始 R^2 、 Q^2 值,表明模型可靠,未出现过拟合现象。

3.1.3 盾叶薯蓣须根响应低磷胁迫差异代谢物的筛选 为了寻找盾叶薯蓣须根响应低磷胁迫高度相关的差异代谢物,在建立的OPLS-DA模型中导出VIP>1的代谢物,找到在Z组与N组、Z组与H组VIP均大于1的物质,见图5,利用Excel计算其在组间处理中的P值,当Z组与N组比较 $P<0.05$ 时,认为该物质为差异代谢物。利用NIST数据库匹配找到候选结构,并结合参考文献选定化合物结构,盾叶薯蓣根茎中响应低磷胁迫的差异代谢物见表1。

Z组与N组须根在OPLS-DA模型中得到8个VIP>1的代谢物,Z组与H组须根得到11个VIP>1的代谢物,共同含有5个潜在差异代谢物,对其在两组中的相对含量进行显著性分析,发现Z组与N组根茎相比 P 均<0.05,肌醇的含量在重度低磷胁迫后含量显著提升,其余4种单糖含量均下降;重度胁迫与中度胁迫相比,肌醇含量同样提高,但5种代谢物均无显著性差异。

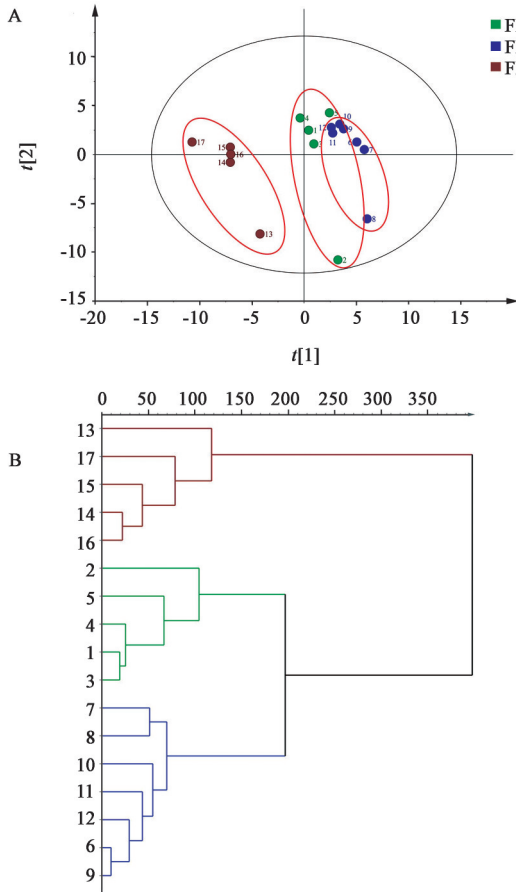


图2 N组与胁迫组盾叶薯蓣须根样品PCA得分(A)、HCA聚类分析(B)

Fig. 2 Results of PCA score (A) and HCA cluster analysis (B) of *Dioscorea zingiberensis* samples from normal and stress groups

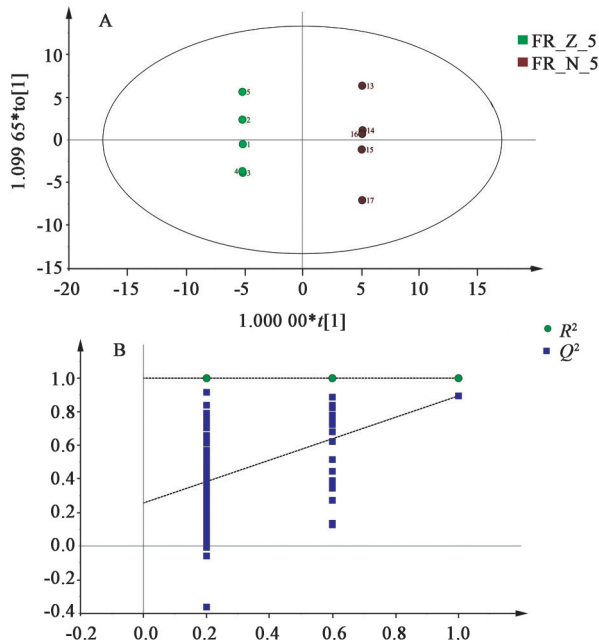


图3 Z组与N组盾叶薯蓣样品OPLS-DA得分(A)、置换检验(B)

Fig. 3 OPLS-DA score (A) and replacement test (B) of *Dioscorea zingiberensis* samples from group Z and group N

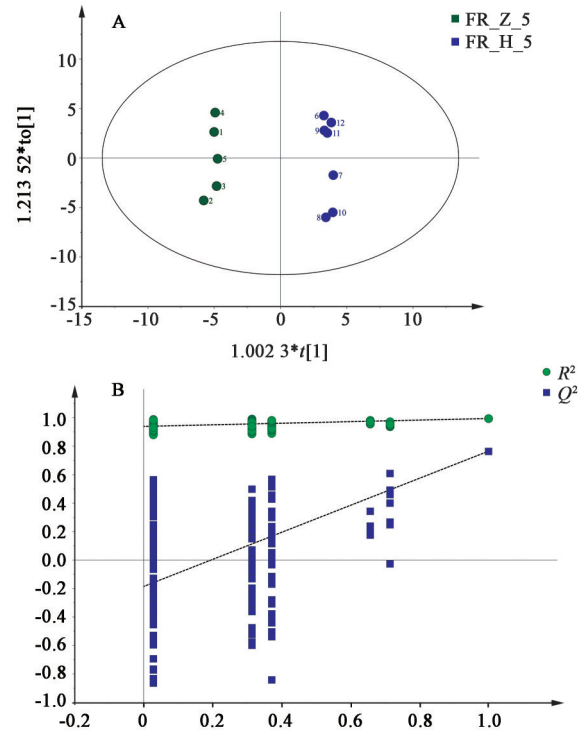


图4 Z组与H组盾叶薯蓣样品OPLS-DA得分(A)、置换检验(B)

Fig. 4 OPLS-DA score (A) and replacement test (B) of *Dioscorea zingiberensis* samples from group Z and group H

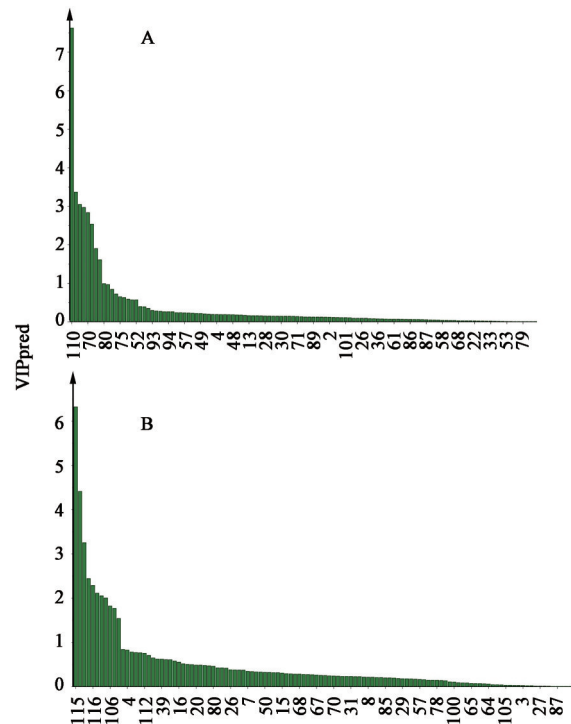


图5 Z组与N组(A)、Z组与H组(B)盾叶薯蓣须根样品GC-MS代谢物的VIP值

Fig. 5 VIP values of GC-MS metabolites from fibrous roots of *Dioscorea zingiberensis* in groups Z and N (A), Z and H (B)

3.2 低磷胁迫下盾叶薯蓣须根差异表达基因分析

3.2.1 须根转录组测序与数据组装 采用

表1 盾叶薯蓣不同磷处理须根中差异代谢物的筛选

Table 1 Screening results of differential metabolites in fibrous roots with different treatments

差异物种类	差异物	FR_Z_5与FR_N_5比较			FR_Z_5与FR_H_5比较		
		VIP>1	P	趋势	VIP>1	P	趋势
糖类	鼠李糖	2.541 8	0.030 0	↓	4.418 8	0.067 5	↓
糖类	D-葡萄糖	7.630 9	0.000 0	↓	2.009 0	0.311 4	↓
糖类	D-甘露糖	3.372 1	0.001 3	↓	1.774 1	0.227 7	↓
醇类	肌醇	1.908 4	0.013 0	↑	1.545 3	0.150 5	↑
醇类	D-半乳糖	1.618 2	0.000 5	↓	2.291 8	0.132 6	↑

BGISEQ-500平台对Z、H、N 3组盾叶薯蓣须根转录组样本进行测序,得到raw reads,去污染、去接头后得到clean reads,clean reads的统计量,见表2。利用Trinity对质量合格的clean reads进行组装,12

个样本测序结果进行de novo组装共得到101 593个Unigene,总长度为 1.28×10^8 nt,平均长度为1 256 nt,N50为1 918 nt,GC含量为43.67%,见表3。

表2 过滤后的Reads质量统计

Table 2 Reads quality statistics after filtering

样品	测序原始序列(M)	高质量序列(M)	高质量总碱基数(Gb)	Q20/%	Q30/%	高质量序列比例/%
H组	74.02	70.31	7.03	97.77	90.18	94.99
N组	74.00	68.59	6.86	97.34	88.86	92.69
Z组	74.06	70.43	7.04	97.50	89.22	95.11

表3 Unigene的质量指标

Table 3 Quality indicators of Unigene

样品	Unigene数量	总长度/bp	平均长度/bp	N50	N70	N90	GC/%
FR_H_5	48 091	48 968 088	1 018	1 507	1 022	472	44.40
FR_N_5	52 277	51 144 351	978	1 497	988	432	44.26
FR_Z_5	43 699	47 610 190	1 089	1 609	1 098	518	44.10

3.2.2 不同处理组须根差异表达基因的统计分析
将须根部位的H组与Z组、N组与Z组进行比较,将差异基因进行统计,须根在H组与Z组、N组与Z组

比较中分别有4 771、7 470个基因上调表达,8 917、12 592个基因下调表达.差异基因筛选的火山图见图6。

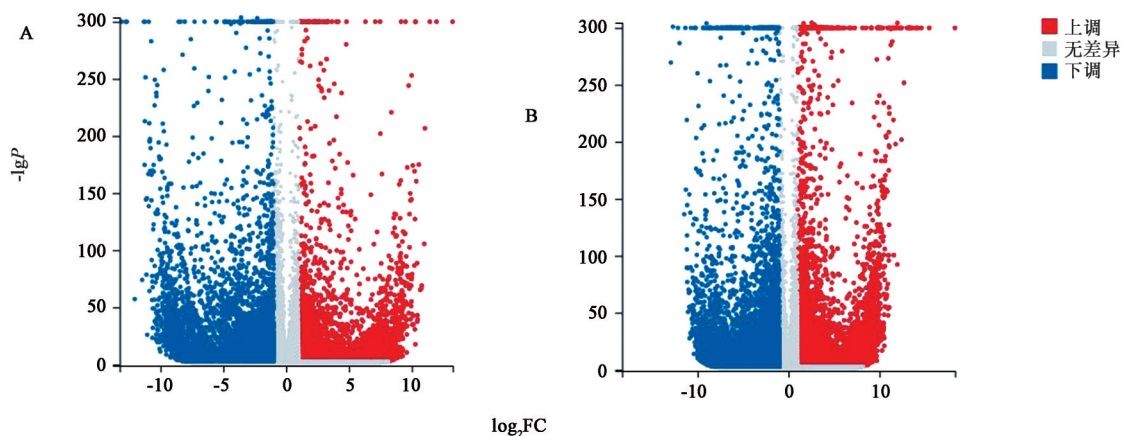


图6 N组与Z组比较(A)、H组与Z组比较(B)差异基因的筛选

Fig. 6 DEGs from N vs Z group(A) and H vs Z group(B)

3.2.3 须根差异表达基因的KEGG注释 须根盾叶薯蓣重度胁迫组与N组、Z组与H组两组对比得到的差异基因经过KEGG数据库的注释,能够定位到对应的Pathway条目中,经过超几何检验,获得差异基因显著富集的Pathway,分别统计差异最显著富集的前20个通路。

须根部位两组对比所得差异基因在KEGG数据库中分别注释到132条代谢通路中,其最显著富集的前20个通路见图7,其中两组对比共同富集的代谢通路有6条,分别为RNA转运(ko03013)、嘌呤代谢(ko00230)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(ko00250)、氮代谢(ko00910)、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化(ko00040)、剪切(ko03040)。此外,在Z组与N组中,有178个差异基因富集到过氧化物酶途径(ko04146),有20个差异基因富集到磷酸

盐和次磷酸盐代谢途径(ko00440);在Z组与H组中,分别有115、94个差异基因富集到谷胱甘肽代谢途径(ko00480)与磷酸戊糖途径(ko00030),且有多个差异基因富集到有机酸类物质的代谢途径,这些基因可能参与了盾叶薯蓣须根对低磷胁迫的响应与调控。

3.2.4 须根部位响应低磷胁迫候选关键酶基因的筛选 须根在Z组与N组、Z组与H组两组对比的差异基因显著富集的前20个代谢通路中,有6个共有通路,通过对其6个共有通路、过氧化物酶途径与磷酸盐和次磷酸盐代谢途径中差异基因互作网络找到有互作关系的基因,共筛选须根中出177个潜在响应低磷胁迫的差异基因,其中有37个为两组对比中共有的差异基因,22个差异基因为Z组与H组特有,118个差异基因在Z组与N组特有。见表4、表5。

表4 FR_H与FR_Z比较差异基因显著富集的前20个通路

Table 4 First 20 significantly enriched pathways of FR_H vs FR_Z differential genes

通路ID	通路名称	富集率	P	Q
ko03013	RNA转运	0.208 113 80	3.55×10^{-9}	4.75×10^{-7}
ko03020	RNA聚合	0.216 802 17	1.89×10^{-5}	0.001 267 424
ko00053	抗坏血酸和醛糖酸盐代谢	0.215 827 34	0.000 235 977	0.010 540 31
ko00010	糖酵解/糖异生	0.199 203 19	0.000 345 95	0.011 589 31
ko03010	核糖体	0.186 431 62	0.000 598 427	0.016 037 85
ko00240	嘧啶代谢	0.188 725 49	0.002 595 615	0.053 834 95
ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.210 653 75	0.003 214 027	0.053 834 95
ko00480	谷胱甘肽代谢	0.203 180 21	0.002 928 587	0.053 834 95
ko00230	嘌呤代谢	0.184 319 12	0.004 505 125	0.067 076 31
ko00630	乙醛酸和二羧酸的代谢	0.193 113 77	0.009 995 257	0.133 936 4
ko00620	丙酮酸代谢	0.192 955 59	0.011 064 07	0.134 780 5
ko00910	氮代谢	0.211 469 53	0.012 213 81	0.136 387 5
ko00340	组氨酸代谢	0.226 190 48	0.014 083 73	0.145 170 8
ko00906	类胡萝卜素生物合成	0.208 480 57	0.016 224 31	0.155 289 8
ko00040	戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化	0.184 818 48	0.047 406 16	0.407 850 4
ko04145	吞噬体	0.185 714 29	0.048 698 56	0.407 850 4
ko00030	戊糖磷酸途径	0.186 507 94	0.053 296 78	0.420 104
ko00310	赖氨酸退化	0.193 916 35	0.074 048 01	0.509 028 1
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢	0.185 022 03	0.074 685 06	0.509 028 1
ko03040	剪接体	0.171 884 59	0.079 773 06	0.509 028 1

4 结论与讨论

低磷胁迫属于一种非生物胁迫,植物在非生物胁迫的作用下,会通过调节体内内源性代谢产物的种类和含量来降低胁迫对其造成的伤害。前期研究发现,低磷胁迫对盾叶薯蓣的地上部分生长无明显影响,但对地下须根的比表面积、长度影响较大,为了进一步研究低磷胁迫下盾叶薯蓣须根代谢产

物的响应特征,本研究利用GC-MS代谢组学技术对不同低磷处理下须根的代谢产物进行分析,结果表明,低磷胁迫下须根部位的内源性小分子物质发生了明显变化,利用PCA与聚类分析两种方法均可以将重度胁迫、中度胁迫与N组的须根代谢物明显区分开来,充分证实了低磷胁迫下盾叶薯蓣会通过调节内源性代谢产物以适应低磷环境,保证植物短期

表5 FR_N与FR_Z比较差异基因显著富集的前20个通路

Table 5 First 20 significantly enriched pathways of FR_N vs FR_Z differential genes

通路ID	通路名称	富集率	P	Q
ko00196	光合作用-触角蛋白	0.445 783 133	1.2×10 ⁻⁶	0.000 169 979
ko03013	RNA 转运	0.242 887 250	0.000 241 207	0.014 163 072
ko03040	剪接体	0.244 935 543	0.000 317 084	0.014 163 072
ko00940	苯丙素的生物合成	0.246 290 801	0.000 666 160	0.022 316 357
ko00945	二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素的生物合成	0.318 518 519	0.002 165 613	0.058 038 428
ko00460	氰基氨基酸代谢	0.264 192 140	0.003 279 196	0.073 235 377
ko04075	植物激素信号转导	0.238 857 939	0.004 218 421	0.080 752 631
ko04146	过氧化物酶体	0.249 649 369	0.006 102 263	0.102 212 905
ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.256 658 596	0.013 377 780	0.199 180 280
ko00195	光合作用	0.266 932 271	0.018 768 540	0.209 582 030
ko00360	苯丙氨酸代谢	0.262 975 779	0.018 561 300	0.209 582 030
ko00500	淀粉和蔗糖代谢	0.233 679 525	0.018 648 080	0.209 582 030
ko03410	碱基切除修复	0.253 768 844	0.020 871 070	0.215 132 568
ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸的代谢	0.242 574 257	0.029 750 300	0.284 752 871
ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	0.251 515 152	0.040 392 540	0.360 840 024
ko00040	戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化	0.239 273 927	0.045 566 170	0.381 616 674
ko00240	嘧啶代谢	0.228 758 170	0.059 831 380	0.421 968 680
ko00300	赖氨酸生物合成	0.313 725 490	0.055 379 760	0.421 968 680
ko00910	氮代谢	0.250 896 057	0.058 102 730	0.421 968 680
ko00440	磷酸盐和次磷酸盐代谢	0.294 117 647	0.065 153 630	0.435 673 498

内正常生长。

差异代谢物的种类可以反映低磷胁迫下盾叶薯蓣体内一些关键代谢途径的变化,对盾叶薯蓣高效低磷品种的精准培育及低磷环境的有效调控具有重要的意义。本研究利用OPLS-DA模型从须根部位中筛选到5个差异代谢物,主要为醇类、糖类等物质,这些物质可能是盾叶薯蓣响应低磷胁迫后产生的关键代谢物质。Z组下须根中肌醇的含量显著高于H组与N组,文献报道肌醇-1-磷酸合酶(MIPS)作为肌醇生物合成的限速酶,在植物逆境胁迫中发挥重要作用^[15],且磷脂酰肌醇具有传导信号、贮藏磷酸盐的作用^[16],差异代谢物作为应答低磷胁迫的最终产物,在应答过程中要受一系列相关基因的调控,因此寻找调控相关代谢的酶基因有助于进一步阐明盾叶薯蓣对低磷胁迫响应的代谢机制。

为了深入探讨低磷胁迫下盾叶薯蓣须根相关基因的表达特征,笔者利用应用BGI500高通量测序和生物信息学技术对不同磷处理下盾叶薯蓣须根样品进行测序,根据基因表达量FPKM值,从Z组与N组须根的基因中筛选到20 062个差异基因,从

Z组与H组中筛选到13 688个差异基因。差异基因显著富集的前20个通路显示,须根部位在Z组与N组、Z组与H组中的差异基因具有6条共同富集的代谢通路。笔者以共有代谢通路为主,根据其差异基因的蛋白网络找到具有互作关系的基因,从盾叶薯蓣须根中筛选到177个盾叶薯蓣响应低磷胁迫的潜在差异基因,这些基因涉及萜类骨架、有机酸、肌醇的生物合成等多个途径,这与盾叶薯蓣须根部位响应低磷胁迫的代谢差异物多为糖类与肌醇等物质相吻合。因此,盾叶薯蓣中须根响应低磷胁迫的基因表达特征与代谢分析中的差异标志物具有密切的关系,这也进一步说明代谢产物是特定环境下基因表达调控的结果^[17-18]。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张新新. 盾叶薯蓣的化学成分及药理作用研究[D]. 西安:西北大学,2015.
- [2] 刘尧,房宇. 黄姜资源分布及利用现状初探[J]. 广东化工,2014,41(21):144-145.
- [3] 谢彩侠,祝侠丽,左春芳,等. 盾叶薯蓣中有效成分含

- 量的影响因素研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10):90-93.
- [4] 韩梅,李东坡,武志杰,等. 持续六年施用不同磷肥对稻田土壤磷库的影响[J]. 土壤通报, 2018, 49(4): 929-935.
- [5] 王荣萍,余炜敏,梁嘉伟,等. 改性生物炭对菜地土壤磷素形态转化的影响[J]. 生态环境学报, 2016, 25(5):872-876.
- [6] ZHANG F, CHEN X, VITOUSEK P. Chinese agriculture: An experiment for the world[J]. Nature, 2013, 497(7447):33-35.
- [7] HASSAN H M, HASBULLAH H, MARSCHNER P. Growth and rhizosphere P pools of legume-wheat rotations at low P supply [J]. Biol Fertility Soils, 2013, 49(1):41-49.
- [8] 张凤霞,王国栋. 现代代谢组学平台建设及相关技术应用[J]. 遗传, 2019, 41(9):883-892.
- [9] SONG E H, KIM H J, JEONG J, et al. A (1)H HR-MAS NMR-based metabolomic study for metabolic characterization of rice grain from various *Oryza sativa* L. cultivars [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(15): 3009-3016.
- [10] ARBONA V, IGLESIAS D J, TALÓN M, et al. Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(16):7338-7347.
- [11] 刘林. 丹参对低磷胁迫的生理响应及基因 SmMYB98b 和 SmMYB9a 的功能研究[D]. 杨凌:西北农林大学, 2018.
- [12] 陈美,戴伟东,李朋亮,等. 基于柱前衍生化 GC-MS 的炒青绿茶加工过程中初级代谢物变化规律研究 [J]. 茶叶科学, 2019, 39(3):297-308.
- [13] AUDIC S, CLAVERIE J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. Genome Res, 1997, 7(10):986-995.
- [14] 李雅静,王丰青,谢彩侠,等. 盾叶薯蓣转录组分析及其皂苷元生物合成关键酶基因的挖掘[J]. 中草药, 2018, 49(16):3885-3894.
- [15] 杨楠. 杨树肌醇代谢关键酶基因的表达及功能研究 [D]. 烟台:鲁东大学, 2017.
- [16] 郭元飞. 肌醇对水稻幼苗抗冷性和小麦幼苗抗旱性的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [17] 姚正培,谢莉,阿斯姆古丽·奥斯曼. 拟南芥 NSP 家族基因序列分析及响应干旱胁迫表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4):1169-1174.
- [18] 古秀娟,曾娅莉,邓建军,等. 代谢组学技术在抗结核新药研发中的应用研究进展[J]. 中国药房, 2019, 30(4):560-565.

[责任编辑 顾雪竹]