DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04173

谷子穗发育期转录组与叶酸代谢谱联合分析

马贵芳¹ 满夏夏¹ 张益娟² 高 豪¹ 孙朝霞^{1,3} 李红英^{1,3} 韩渊怀^{1,3}
侯思宇^{1,3,*}

¹ 山西农业大学农学院 / 农业生物工程研究所, 山西太谷 030801; ² 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; ³ 杂粮种质资源发掘与遗传改良山西省重点实验室, 山西太原 030031

摘 要: 植物叶酸(Folate, FA)参与细胞内一碳单位转移反应, 是能量代谢、氨基酸和核酸合成的重要供体。前期我们发现, 谷子籽粒叶酸含量高于其他禾谷类作物, 但叶酸代谢组分特征目前尚不清楚。本研究以‘晋谷 21’为试验材料, 对 3 个穗发育期小穗进行叶酸代谢组分析; 通过 RNA-seq 分析穗发育期差异表达基因及叶酸合成途径相关代谢通路, 探究叶酸组分与叶酸代谢途径基因表达模式及其与可变剪切的相关性, 同时预测分析叶酸合成途径基因的蛋白互作网络。结果表明, 总叶酸含量随穗发育阶段呈下降趋势; 5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-M-THF)和 10-甲酰叶酸(10-formyl folic acid, 10-F-FA)是穗发育期的主要组分。17 个叶酸合成关键基因表达模式可划分为 2 个不同类群。转录起始区域(transcription start site, TSS)和转录终止区域(transcription terminal site, TTS)可变剪切是叶酸合成关键基因在穗发育 3 个时期均发生的可变剪切类型, 外显子跳跃(exon skipping, ES)、内含子滞留型(intron retention, IR)和可变 5'或 3'端剪切(alternative exon ends, AE)是特有类型。同时发现叶酸合成、一碳代谢和激素信号传导途径关键基因与叶酸组分差异具有相关性, 初步推测谷子穗发育过程叶酸合成途径及偶联途径相关基因的表达一定程度影响叶酸含量变化, 其中 *ADCS*、*DHFR2* 和 *GGH* 基因的差异表达可能为影响谷穗叶酸含量的主要原因, 可作为利用遗传工程提高谷子叶酸含量及生物强化分子育种的关键靶基因。

关键词: 谷子; 叶酸; 转录组; 代谢组

Integrated analysis between folate metabolites profiles and transcriptome of panicle in foxtail millet

MA Gui-Fang¹, MAN Xia-Xia¹, ZHANG Yi-Juan², GAO Hao¹, SUN Zhao-Xia^{1,3}, LI Hong-Ying^{1,3}, HAN Yuan-Huai^{1,3}, and HOU Si-Yu^{1,3,*}

¹ College of Agriculture / Institute of Agricultural Bioengineer, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; ² College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; ³ Shanxi Key Laboratory of Genetic Resources and Breeding in Minor Crops, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: Folate (FA) is an important donor for energy metabolism, amino acid and nucleic acid synthesis, and participates in the intracellular carbon unit transfer reaction. In previous study, we found that folate content in panicle of foxtail millet was higher than other cereal crops, but the composition characteristics of folate metabolites are still unclear. In this study, in order to explore the expression patterns of folic acid components and folic acid metabolism pathway genes and their correlation with variable shear, and to predict the protein interaction network of folic acid synthesis pathway genes, folate metabolome was performed on three panicle development stages using the middle part of the ‘Jingu 21’ panicles as the experimental materials by RNA-seq. The results

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD1000705-2)、山西省高等学校科学研究优秀成果培育项目(2019KJ020)、山西农谷建设科研专项(SXNGJSKYZX201702)和山西农业大学青年科技创新基金项目(2019005)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD1000705-2), the Cultivation Project of Excellent Scientific Research Achievements in Shanxi Universities (2019KJ020), the Shanxi Agricultural Valley Construction Research Project (SXNGJSKYZX201702), and the Shanxi Agricultural University Youth Science and Technology Innovation Found Project (2019005).

* 通信作者(Corresponding author): 侯思宇, E-mail: bragren123@163.com

第一作者联系方式: E-mail: 1783526621@qq.com

Received (收稿日期): 2020-07-29; Accepted (接受日期): 2020-11-13; Published online (网络出版日期): 2020-12-15.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201215.1451.019.html>

showed that the total folate content decreased with panicle development stage, and the contents of 5-methyl tetrahydrofolate (5-M-THF) and 10-formyl folate (10-F-FA) were the main components of panicle development. The expression pattern analysis of 17 key genes of folate synthesis can be divided into two groups during the panicle development in foxtail millet. The alternative splicing showed that the 16 key genes for folate synthesis produced transcription start site (TSS) and transcription terminal site (TTS) during the panicle development, the number of other types of alternative splicing was different at each stage, and this specific alternative splicing affects folate content. In addition, methylation pathway, hormone signaling pathway and immune pathway related genes showed a certain correlation with different folate metabolite content, and we preliminarily hypothesized that the expression of folate synthesis related and coupling pathway genes would influence the folate content during the panicle development. The different expression of *ADCS*, *DHFR2*, and *GGH* may be the main reason for the influence of folate content in panicle, and could be used as key target genes for folate biofortification of foxtail millet by genetic engineering technology in the future.

Keywords: foxtail millet; folate; transcriptome; metabolomics

叶酸是由蝶呤、对氨基苯甲酸和多聚谷氨酸组成的一种水溶性 B 族维生素, 又称维生素 B₉ 或维生素 M^[1], 作为细胞中主要的一碳单位供体和受体参与生物体内一碳代谢^[2]。四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF)是一碳单位的主要载体, 在其转运过程中起辅酶作用, 如嘌呤和胸腺嘧啶的合成^[3]。在生物界中, 植物、真菌和大多数细菌能够从头合成叶酸, 但高等动物包括人类却无法合成, 完全依赖日常饮食摄入来完成体内生理生化过程。叶酸在人体内主要以 5-甲基四氢叶酸(5-methyltetrahydrofolate, 5-M-THF)参与代谢过程时转化为 THF 形式发挥作用^[4]。在植物中, 叶酸生物合成有明显细胞区域化特征, 分别于叶绿体、细胞质和线粒体中合成^[5]。其中, 蝶呤和对氨基苯甲酸(p-Aminobenzoate, pABA)在胞质和叶绿体中合成; 随后, THF 分子在线粒体中组装, 并添加谷氨酸尾巴。蝶呤部分的合成始于由鸟苷三磷酸环化水解酶(GTP cyclohydrolase I, GCHI)催化 GTP 生成二氢新蝶呤三磷酸(dihydroneopterin triphosphate, DHN-P₃), DHN-P₃ 经磷酸水解生成二氢新蝶呤(dihydroneopterin, DHN), DHN 在二氢新蝶呤醛缩酶(dihydroneopterin aldolase, DHNA)作用下生成羟甲基二氢蝶呤(dihydroneopterin to 6-hydroxymethyldihydropterin, HMDHP)。

植物体合成 pABA 分为 2 步, 第 1 步是由氨基脱氧分支酸合成酶(aminodeoxychorismate synthase, ADCS)作用生成氨基脱氧分支酸(aminodeoxychorismate, ADC), 第 2 步由氨基脱氧分支酸裂解酶(aminodeoxychorismate lyase, ADCL)催化 ADC 生成 pABA。最后, 在线粒体中合成叶酸(图 1, 参考单齐冀^[6], 略作修改)。HMDHP 在羟甲基二氢蝶呤焦磷酸激酶(hydroxymethyldihydropterin pyrophospho kinase, HPPK)催化下生成 HMDHP-P₂, HMDHP-P₂ 与 pABA 偶联, 生成二氢蝶呤(dihydropteroate, DHP)。这个反应是由二氢蝶呤合成

酶(dihydropteroate synthase, DHPS)介导的, DHPS 催化 DHP 和谷氨酸生成二氢叶酸(dihydrofolate, DHF), 经二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)催化 DHF 生成 THF; 最后经多谷氨酰四氢叶酸合成酶(folylpolyglutamate synthase, FPGS)催化 THF 加多聚谷氨酸尾巴生成多谷氨酰四氢叶酸(polyglutamic acid tetrahydrofolic acid, THF-Glu_n), 这种叶酸分子主要参与一碳代谢的叶酸依赖型酶促反应^[5]。鸟苷三磷酸环化水解酶(gamma-glutamyl hydrolase, GGH)的活性可去除多谷氨酸尾巴, 在调节叶酸稳态中起重要作用^[7]。

谷子[*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]距今已有八千年的栽培历史^[8], 是一种营养价值极高的杂粮作物^[9]; 其籽粒脱壳后为小米, 富含蛋白质、脂肪、糖类、维生素, 以及钙、磷、铁等人体所必需的微量元素。粮食类作物的叶酸含量在 0.39~2.63 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW 之间, 其中小米中总叶酸含量为 1.53 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 远高于燕麦、苦荞、薏米和水稻, 但与人体每日摄取推荐量日常推荐摄入标准(400~500 μg)相比, 差距较大^[10]。目前谷子叶酸的研究尚停滞在叶酸提取及含量测定方法优化和种质资源评价等方面, 如邵丽华等^[11]利用磷酸二氢钾溶液恒温水浴浸提叶酸, 并通过高锰酸钾氧化-间接荧光法测定 245 份谷子资源的叶酸含量发现, ‘晋谷 21’为高叶酸含量品种。侯思宇等^[12]利用改良三酶法结合高效液相色谱法(HPLC)测定 2 年同一环境下种植的 45 份谷子资源叶酸含量发现, ‘晋谷 21’总叶酸含量为(2.00±0.02) $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, 在所有测试品种最高。为达到生物强化的目的, 在水稻^[13]、玉米^[14]、小麦^[15]等作物中已做了一些叶酸代谢特征及相关基因表达模式的研究。Storozhenko 等^[16]报道, 通过强化 pABA 和蝶呤支路获得了比对照品种叶酸含量提升 100 倍的水稻种子。汪冉冉^[17]利用基因枪法将 *GCHI* 与 *ADCS* 基因转入小麦幼胚愈伤组织中, 收获的 T₁ 代小麦籽粒中

图1 植物细胞中叶酸的生物合成

Fig. 1 Biosynthesis of folate in plant cells

叶酸含量显著提升。尽管前人对谷子叶酸提取及含量测定等进行了相关研究,但针对其代谢物种类及代谢分子机制方面的研究尚属空白。因此,本研究拟通过液相色谱-串联质谱法(LC-MS),初步揭示谷子穗发育过程中叶酸代谢物积累的动态规律;结合转录组分析挖掘叶酸代谢物与相关基因表达模式的相关性,找到潜在的叶酸强化靶基因,以期为谷子叶酸生物强化奠定理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

‘晋谷21’于2019年4月中旬种植于山西农业大学杂粮基地(东经112°28',北纬37°12')。分别对灌浆中前期(S1,抽穗后25 d)、灌浆中后期(S2,抽穗后39 d)和收获期(S3,抽穗后53 d)的穗中部进行取材。每个时期收集10个单穗相同部位的小穗混合为测试材料,-80℃保存备用。

1.2 叶酸代谢物提取与LC-MS法测定

参考Wan等^[18]方法提取叶酸。5 g样品粉末沸水浴10 min,迅速转移至冰上;加入15 μL α-淀粉酶(30 min, 37℃)和20 μL 蛋白酶(60 min, 37℃)后离心(4℃, 10,000×g, 20 min),取上清液20 μL过滤后进行液相色谱-串联质谱法(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析。使用Agilent 1260 HPLC系统和Agilent分析柱(Poroshell 120 SB-C18, 2.1 mm×75.0 mm, 2.7 μm)进行色谱分析,在4℃下进样15 μL,柱温箱温度保持在25℃。流动相为0.1% (v/v)水甲酸

和0.1% (v/v)乙腈甲酸,流速0.3 mL min⁻¹,梯度程序为20 min。使用Agilent 6420三重串联四极杆液质联用系统与电子喷雾电离界面进行叶酸的分析和定量。质谱仪(MS)在阳离子模式下运行,使用Agilent Mass Hunter软件采集并分析数据,12种叶酸化合物作为内标进行定量分析(测定参数见附表1)。

1.3 转录组数据分析

如1.2所述材料,每个时期设置3个生物学重复,提取总RNA。RNA-seq由派森诺生物科技有限公司(上海)完成,在Illumina Hi Seq 2500平台上构建了9个文库并对这些文库进行双末端(Paired-end, PE)测序,原始数据经过质控后过滤掉低质量测序 Reads,使用HISAT2 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)软件将过滤后的 Reads 比对到参考基因组(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Sitalica)上。使用HTSeq计算基因表达量,用FPKM值表示。DESeq软件分析基因表达差异,设置参数为:表达差异倍数|log₂ Fold Change|>1,显著性 P-value<0.05。对差异表达基因(difference expression genes, DEGs)进行KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析。

1.4 基因可变剪切、共相关分析及差异基因蛋白网络互作分析

采用String Tie (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/index.shtml>)对HISAT2比对结果拼接,通过ASprofile (<http://ccb.jhu.edu/software/ASprofile/>)软件获取每个样品可变剪接类型。用SPSS 20.0软件进行双变量分析, Pearson 相关系数进行相关性分析。利

用 STRING 网站(<http://string-db.org/>)构建谷子不同代谢路径基因间蛋白互作网络。

2 结果与分析

2.1 谷子穗发育期穗部叶酸组分特征

由图 2 可知, 12 种叶酸标准物中可检测到 9 种化合物, 分别是 5-M-THF、5-M-THFGlu₃、5-M-THFGlu₄、5,10-CH=THF、10-F-FA、5-F-THF、5-F-THFGlu₂、5-F-THFGlu₄ 和 FA。整个穗发育期, 对叶酸含量贡献最大的为 5-M-THF 和 10-F-FA, 尤其在 S1, 二者含量分别达到 1.27 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW 和 1.64 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW, 显著高于其他时期的其他叶酸组分。其次为

5-F-THFGlu₂, 在 S1~S3 期含量分别为 1.22、0.78 和 0.56 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW。而 5-M-THFGlu₃ 和 5-M-THFGlu₄ 只在 S2 和 S3 期被检测到, 5,10-CH=THF 只在 S2 期被检测到。相比其他叶酸组分, 5-F-THFGlu₄ 整体含量最低, 尤其在 S1 期含量仅为 0.0014 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW。而在 S1~S3 期, 并未检测到 THF、5-M-THFGlu₂ 和 5-F-THFGlu₃ 的积累。同时, 本研究发现总叶酸含量随谷穗发育时期呈下降趋势, S1~S3 含量分别为 3.77、3.21 和 1.89 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW, 与 10-F-FA 和 5-M-THF 含量随穗发育期下降趋势相一致。其他组分如 FA 含量在穗发育不同阶段整体差异不显著。表明 10-F-FA 和 5-M-THF 含量是影响谷穗不同发育阶段叶酸总含量的主要组分。

图 2 穗发育不同时期叶酸含量及种类

Fig. 2 Folate content and compounds at different panicle development stages

S1: 灌浆中前期; S2: 灌浆中后期; S3: 收获期。柱上不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

S1: the middle and early grain filling stage; S2: the middle and late grain filling stage; S3: harvesting stage. Different lowercase letters above the bars mean significantly different at the 0.05 probability level.

2.2 转录组数据组装与样品相关性分析

RNA-seq 结果显示, 相同生物重复的样本间相关性较好, 相关性范围在 0.982~1.000; 不同时期小穗样品间相关性在 0.011~0.803 之间, 表明不同样品之间有明显差异(附图 1)。对 9 个 RNA-Seq 文库测序过滤后分析得 Clean Reads 在 93.47%~94.91% 定位到参考基因组上且各样品 Q30 碱基百分比平均不小于 93.27% (附表 2), 证明我们样本选择的合理性和试验结果的可靠性。

2.3 谷穗发育时期差异表达基因分析

基于 RNA-seq 两两组合比较分析, 共鉴定出 4700 个 DEGs。其中 S1 vs. S2 鉴定出 2263 个 DEGs, 包含 1213 个表达上调和 1050 个表达下调基因; S1 vs. S3 鉴定出 3480 个 DEGs, 上调和下调表达的基因数为 1370 个和 2110 个; S2 vs. S3 中鉴定出 1577 个 DEGs, 包含 737 个和 840 个表达上调和下调基因(图 3-a)。

S1 vs. S2 和 S1 vs. S3、S1 vs. S2 和 S2 vs. S3、S1 vs. S3 和 S2 vs. S3 的两两组合之间交集分析发现,

图 3 穗发育不同时期 DEGs 表达数量(a)和差异表达基因韦恩图(b)

Fig. 3 Number of DEGs expression (a) and Venn diagram of differentially expressed genes (b) at different panicle development stages 缩写同图 2。Abbreviations are the same as those given in Fig. 2.

分别存在 1381、372、1045 个 DEGs, 其中 688 个 DEGs 特异的存在于 S1 vs. S2, 1232 个 DEGs 特异的存在于 S1 vs. S3, 338 个 DEGs 特异存在于 S2 vs. S3, 三者共有的 DEGs 为 178 个(图 3-b)。

对上述 DEGs 进行功能注释, 共有 7121 个可注释到 NR 数据库, 占比 99.3%; 接下来依次为 eggNOG、Swiss-ProtGO 和 KEGG (附图 2)。KEGG 注释分析表明, 两两比较得到的 DEGs 可注释到生物体系统、新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理和细胞过程, 共计五大类(附图 3-a~c)。其中涉及新陈代谢类的基因数量最多, 在 S1 vs. S2、S1 vs. S3、S2 vs. S3 中分别占总注释基因数量的 81.8%、81.9%和 79.2%。同时发现, 苯丙烷类物质的生物合成、淀粉和蔗糖代谢和植物激素信号传导这 3 个代谢通路中差异表达基因数目较多, 其中 S1 vs. S2 分别达到 42、31 和 23 个; S1 vs. S3 分别为 75、43 和 31 个; S2 vs. S3 分别有 21、22 和 13 个。

2.4 谷子穗发育时期基因的可变剪切类型及数目变化

在 S1~S3 期共检测到 19,017 个基因, 包含 54,297 处可变剪切, 根据剪切方式不同划分为 5 种类型, 分别为外显子跳跃型(exon skipping, ES)、内含子滞留型(intron retention, IR)、转录起始区域可变剪切(transcription start site, TSS)、转录终止区域可变剪切(transcription terminal site, TTS)和可变 5'或 3'端剪切(alternative exon ends, AE)。其中, TTS 和 TSS 为主要可变剪切类型, 占比均为 37.2%; 其次为 IR、AE 和 ES, 分别占 15.8%、5.0%和 4.8%。可变剪切数目在穗发育时期呈动态变化, 如 S1、S2、S3 TTS 类型可变剪切发生的数目分别为 20,744、19,969 和 20,066 个(图 4)。叶酸生物合成途径上有 16 个关键

基因发生可变剪切且类型具有明显差异, 如只有 *ADCL1*、*DHFR1*、*DHFR2* 基因发生 ES 剪切, AE 剪切只出现在 *ADCS*、*DHFR2*、*FPGS1*、*FPGS2* 基因中, 而 IR 剪切仅在 *ADCS*、*DHFS*、*DHFR1*、*DHFR2*、*FPGS1* 中被预测到。同时各时期可变剪切数目呈动态变化, 如 *DHFS* 基因在 S1、S2、S3 可变剪切发生数目分别为 3、2、4 个(附表 3)。

图 4 穗发育不同时期可变剪切数目

Fig. 4 Number of alternative splicing events at different panicle development stages

缩写同图 2。Abbreviations are the same as those given in Fig. 2.

2.5 叶酸合成途径相关基因表达与叶酸代谢物共相关分析

通过对叶酸代谢相关 17 个基因在穗发育期的表达特征分析发现, 有 11 个和 6 个基因分别在 S2 和 S3 期表达水平较低, 根据其基因表达模式可将上述基因聚为 2 类(Group 1 和 Group 2)(图 5)。在 Group 1 中 *ADCL3* 和 *GGH* 在 S2 表达量最高, 可达 37.52 和 37.32; *ADCS*、*ADCL1*、*GGH*、*DHFR1*、*DHFR2* 表达随着穗发育整体呈下降的趋势, 如 *ADCS* 在 3 个时期的表达量分别为 11.85、5.61、6.33。Group 2 中

基因又可分为 2 个亚类(I 和 II), I 类中包含 *FPGS1*、*FPGS2*、*DHFS*、*ADCL2*、*DHPS1*、*DHPS2*、*HPPK1*、*HPPK2* 和 *DHNA1* 共 9 个基因, 呈现出 S1、S3 期高表达的特点; 在 II 类中包含 *DHNA2* 和 *GCHI*, 仅在 S3 期表达水平较高(附表 4)。叶酸合成与叶酸类化合物的相关性分析表明, 5-M-THF 的含量与 *DHNA2* 呈

显著负相关($r = -0.999$, $P < 0.05$), 与 *GCHI* 呈极显著负相关($r = -1.000$, $P < 0.01$); 10-F-FA 和 5-F-THFGlu₂ 的含量分别与 *GGH* 和 *DHFR2* 基因的表达呈显著正相关($r = 0.999$, $P < 0.05$); FA 的含量与 *ADCS* 呈显著正相关($r = 1.000$, $P < 0.05$) (附表 5)。其他叶酸化合物与叶酸代谢相关基因表达无显著相关性。

图 5 叶酸代谢相关基因表达分析

Fig. 5 Relative expression of folate metabolism-related genes
缩写同图 2。Abbreviations are the same as those given in Fig. 2.

2.6 叶酸偶联相关途径的基因表达与叶酸代谢物共相关分析

对叶酸偶联的一碳代谢相关基因表达聚类发现, 21 个基因在 3 个时期内据表达量可以聚为三大类, Cluster A1 中包含 10 个基因, 在 S1 期表达量较高, 如 *SHMT3* (serine hydroxymethyltransferase 3, 丝氨酸羟甲基转移酶 3), 在 3 个时期的表达量分别为 205.75、48.45 和 38.44; Cluster A2 内 5 个基因在 S2 期达到最高表达, 如 *CMT1* (methyltransferase, 甲基转移酶) 的表达量为 3.03、12.54 和 10.17。Cluster A3 内 6 个基因在 S3 期表达较高, 如 *SHMT1* (serine hydroxymethyltransferase 1, 丝氨酸羟甲基转移酶 1), 穗发育期表达量分别为 69.80、69.14 和 80.02 (图 6-a)。相关性分析发现, Cluster A1 中基因与主要叶酸化合物呈正相关关系, 如 10-F-FA 与 *MET3* 呈显著正相关($r = 1.000$, $P < 0.05$); Cluster A2 中 *SHMT1* 与主要叶酸化合物 5-F-THFGlu₂ 呈显著负相关($r = -0.998$, $P < 0.05$) (附表 6)。

激素传导途径关键基因表达聚为 3 类, 其中 Cluster B1 中的 4 个基因在 S2 表达较高, 如 *ABF* (ABRE binding factor, ABRE 结合因子), 表达量分别为 22.19、24.55 和 22.34; Cluster B2 中 16 个基因在 S3 期高表达, 且整体表达呈逐渐升高趋势, 如 *ETR* (ethylene receptor, 乙烯受体, 表达量为 0.01、6.91

和 15.92); Cluster B3 中 17 个基因在 S1 高表达, 且在穗发育后期整体表达量降低, 如 *COI1* (coronatine-insensitive protein 1, 冠氨酸不敏感蛋白 1, 表达量为 110.88、49.70 和 68.77)。相关性分析发现, Cluster B2 中基因与主要叶酸化合物呈负相关关系, 如 *BRI1* (protein brassinosteroid insensitive 1, 油菜素内脂膜受体) 与 5-F-THFGlu₂ 呈显著负相关($r = -0.998$, $P < 0.05$); Cluster B3 中基因与主要叶酸化合物呈正相关关系, 如基因 *ARF* (auxin response factor, 生长素响应因子) 与 FA 呈显著正相关($r = 0.999$, $P < 0.05$) (图 6-b 和附表 7)。

2.7 差异表达基因蛋白网络互作分析

叶酸合成基因 *DHFR1*、*DHFR2* 与叶酸偶联一碳代谢相关甲基化基因 *DDM1*、*DDM2*、*MET1*、*MET3* 之间存在共表达和互作关系(图 7-a); 相关性分析表明, *DHFR2* 与 *MET3* 之间呈极显著正相关(附表 8)。在叶酸合成相关基因与激素信号传导途径关键基因的蛋白网络分析中发现, *DHFR1* 与 *DHFR2* 并没有直接关联到激素类蛋白, 而是通过免疫相关蛋白 *elf8*、*HSP90*、*SGT1* 来连通互作, 其中激素相关蛋白 *FLS2*、*MPK6*、*MAPK1/3*、*COI1*、*EDS1*、*RAR1* 与免疫蛋白也存在互作(图 7-b); 同时发现免疫相关基因 *SGT1* 与激素途径关键基因 *MPK6* 呈显著正相关(附表 9)。

图 6 叶酸偶联的一碳代谢(a)和激素信号传导(b)相关途径基因表达水平分析

Fig. 6 Relative expression of folate-coupled one-carbon metabolism (a) and hormone signaling pathways (b)

缩写同图 2。Abbreviations are the same as those given in Fig. 2.

图 7 差异表达基因蛋白网络互动模式图

Fig. 7 Protein network interaction pattern of differentially expressed genes

a: 叶酸合成蛋白与一碳代谢关键蛋白网络分析; b: 叶酸合成蛋白与激素传导蛋白网络分析。DDM1(2): DNA 甲基化降解酶 1(2); MET1(3): 甲基转移酶 1(3); *elf18*: 延伸因子; HSP90: 热休克蛋白 90; SGT1: *skp1* 基因 G2 等位基因的抑制子; FLS2: 跨膜受体激酶; MPK6: 丝裂原活化蛋白激酶; MAPK1/3: 有丝分裂原活化蛋白激酶 1/3; COI1: 冠氨酸不敏感蛋白 1; EDS1: 增强疾病易感性 1 蛋白; RAR1: 抗病蛋白。浅蓝色及粉色线条: 已知互作蛋白; 深绿、红色、深蓝线条: 预测互作蛋白; 浅绿线条: 文本挖掘; 黑色线条: 共表达; 紫色线条: 同源蛋白。

a: folate synthesis protein and one-carbon metabolism key protein network analysis; b: folate synthesis protein and hormone conduction protein network analysis. DDM1(2): decrease in DNA methylation 1(2); MET1(3): methyltransferase 1(3); *elf18*: elongation factor Tu; HSP90: heat shock protein 90; SGT1: suppressor of G2 allele of *skp1*; FLS2: FLAGELLIN SENSING 2; MPK6: Mitogen-activated protein kinase 6; MAPK1/3: Mitogen Activated Protein Kinase 1/3; COI1: coronatine-insensitive protein 1; EDS1: enhanced disease susceptibility 1 protein; RAR1: disease resistance protein. Light blue and pink lines: known interactions; Dark green, red, and blue lines: predicted interactions; Light green line: text mining; Black line: co-expression; Purple line: protein homology.

3 讨论

3.1 谷穗发育过程中叶酸合成途径关键基因表达影响叶酸代谢物组成特征

谷子籽粒富含叶酸, 可作为人们日常摄入天然叶酸的来源之一。深入探讨其籽粒中叶酸代谢谱分布特征及相关基因表达模式, 为挖掘叶酸代谢关键基因, 获得高稳定性叶酸材料, 培育高品质谷子品

种提供思路。Lian 等^[19]在研究玉米籽粒发育过程叶酸含量发现, 随着生育期的推进, 叶酸含量呈下降趋势, 这与本研究中谷穗叶酸含量变化规律一致。成熟小穗鲜样中所测得的叶酸总含量为 $1.89 \mu\text{g g}^{-1}$ FW, 与本实验室测定干样含量存在差异 ($2.02 \mu\text{g g}^{-1}$ DW)^[12], 这是含水量差异所致。此外, 本研究仅用 12 个叶酸标准代谢物进行分析, 无法检测到谷穗中

所有叶酸衍生物种类及含量,也是导致测定结果差异的原因。

结合叶酸合成基因探讨叶酸含量变化与基因表达之间的关系发现,穗发育 3 个时期,叶酸合成起始基因 *GCHI* 的表达整体呈上升趋势,而分支酸途径叶酸合成起始基因 *ADCS* 的表达量呈下降趋势,同时总叶酸和主要叶酸代谢物含量随穗发育成熟均呈下降趋势,推测这可能是由于穗发育后期 *ADCS* 基因低表达降低了 pABA 的合成量,导致总叶酸含量下降。韩娟英等^[20]研究结果也表明,只有叶酸合成基因 *GCHI* 和 *ADCS* 同时高表达,总叶酸含量才可提升。

本研究发现,在 S1 期,11 个叶酸合成基因处于高表达水平,预示着叶酸代谢物在穗发育初期大量合成。结合叶酸含量测定,S1 期 5-M-THF 的含量占总 5-M-THF 含量的 46%,S2 期占 41%,而 S3 期仅占 13%。一碳代谢甲基化相关基因的表达也是影响叶酸代谢物含量变化的重要因素,即 THF 大量合成后被甲基化,叶酸代谢物稳定存在,即可保持高含量的叶酸,反之则含量降低,这也是成熟谷穗中叶酸含量降低的重要原因。Lian 等^[19]对玉米籽粒中叶酸含量的研究发现,在未成熟籽粒中的 5-M-THF 的含量高于成熟玉米籽,进一步推测 5-M-THF 在穗发育前期高含量可能是由于籽粒发育早期一碳循环更活跃造成;Blancquaert 等^[21]在水稻 pABA 含量上也观察到类似的情况。除此之外,叶酸介导所有生物必需的一碳转移反应,如 10-F-THF 和 5,10-CH=THF 衍生物的代谢参与嘌呤和胸苷酸的产生^[22],*SHMT1* 通过参与羟甲基转移为生物合成提供一碳单位,并影响叶酸代谢;*DHFR2* 作为一碳途径和叶酸合成途径的关键基因,与叶酸主要化合物之间联系紧密。在拟南芥中,THF 合成的倒数第 2 个步骤是由双功能二氢叶酸还原-胸苷酸合成酶(DHFR-TS)催完成^[23-24]。在这类双功能酶中,DHFR 酶位于 N 端,将经过 TS 形成的 DHF 还原为 THF^[25]。此外,在本研究中发现,*GGH* 基因在 S3 期表达量降低,这可能是由于 *GGH* 在叶酸代谢通路中所在的位置决定的,已有研究表明,当 *GGH* 基因过表达时,*DHFR* 基因表达量下降,这是由于 *GGH* 过表达催化叶酸由聚谷氨酰胺化水解为单谷氨酰胺化(叶酸在循环中存在的唯一形式),生成大量的 THF,从而抑制了 DHFR 酶的活性;当 *GGH* 表达被抑制时,DHFR 酶的活有所上升^[26]。上述结果暗示,*ADCS*、*DHFR2* 和 *GGH* 基因可作为通

过遗传改良提升叶酸含量的关键靶基因,为创制高叶酸含量新种质提供可能。

3.2 可变剪切事件可能影响叶酸代谢物含量变化

可变剪切是基因转录后调控的重要手段,提高真核生物有遗传水平的多样性,研究表明可其在植物的生长发育过程中发挥重要的调控作用^[27]。本研究发现,16 个叶酸合成关键基因发生了不同类型的可变剪切,且在穗发育不同时期可变剪切数目不同。研究表明,IR 的发生可在转录本中插入提前终止密码子,使基因表达下调^[28]。本研究中,*FPGS1* 的表达量远低于 *FPGS2*,比较发现,*FPGS1* 在 S1~S3 期均发生了 IR 剪切,而 *FPGS2* 并未发生此类型剪切。另有研究证实 AE 与 ES 剪切类型更易改变蛋白质的结合性质、活性和稳定性,产生功能变化的蛋白质^[29-31]。在本研究中 *DHFR1* 在 3 个时期发生这 2 种类型剪切数目分别为 0、1 和 2 个,相应时期基因表达量分别为 36.48、28.58 和 13.51;*DHFR2* 基因剪切数目分别为 4、5 和 3 个,表达量为 18.50、13.69 和 11.73,通过剪切数目与表达量的差异推测 *DHFR2* 的氨基酸顺序发生了改变,从而使基因表达降低,蛋白活性改变^[32]。这些结果暗示这种高频率可变剪切的发生可能与穗发育不同时期的叶酸含量动态变化密切相关,叶酸代谢相关基因的可变剪切事件可能直接影响叶酸化合物代谢,但其具体影响机制尚需进一步验证。

3.3 谷穗叶酸代谢参与植物激素和免疫途径协同调控植物生长发育过程

叶酸代谢与一碳代谢途径密切相关,并通过免疫途径来调节激素信号传导。已有研究发现,叶酸代谢途径通过调节蛋氨酸合酶控制的 DNA 甲基化来干扰植物免疫^[33]。叶酸在甲基化反应中提供 S-腺苷蛋氨酸,是甲基化反应的关键因素^[34]。本研究发现,一碳代谢甲基化关键酶基因 *DDM1*、*DDM2*、*MET1*、*MET3* 与叶酸合成基因 *DHFR1*、*DHFR2* 之间有直接关系,但叶酸代谢基因与甲基化相关基因之间具体调控关系尚不明确。Wang 等^[35]发现,高水平的 THF 诱导 *MET1* 介导的拟南芥开花调节基因(*FWA*)表现出转录活性,从而导致花期延迟,且呈剂量依赖性。本研究中晋谷 21 为春播晚熟品种,整个生育期需要 130 d 左右,而从 S1 到 S3 期需要 50~60 d,相比其他谷子品种生育期较长,我们推测这可能与穗部早期叶酸大量合成,启动甲基化基因表达,抑

制相关开花基因的转录活性,从而延迟了穗发育时期和生育期有关。

激素信号传导在植物的生命活动中有着重要作用。水稻中叶酸含量的升高可诱导抗病相关基因的表达,如胞内免疫受体 RPM1^[21],增强抗病的能力。本研究中 FLS2、MPK6、MAPK1/3、COI1、EDS1、RAR1 等激素信号传导途径的蛋白与叶酸途径关键蛋白之间通过抗病蛋白相互作用。这暗示着免疫途径关键蛋白 elf8、HSP90、SGT1 可能是叶酸途径与激素途径偶联的关键蛋白。同时, Finni 等^[36]研究发现,高叶酸可增强拟南芥对黑斑病菌的抗性,但这种抗性的产生依赖于水杨酸的生物合成。肖熙欧等^[37]研究表明,EDS1 是调控水杨酸合成基因 *ICS1* 和水杨酸下游信号基因表达的重要因子,在植物抗病过程中发挥着重要作用。本研究通过蛋白网络分析发现,EDS1 通过免疫蛋白 SGT1 与叶酸合成基因蛋白 DHFR1 和 DHFR2 有互作关系,这进一步证明叶酸对激素信号传导和抗病机制调控有一定的影响,但机制尚不明确。

4 结论

首次解析‘晋谷 21’穗发育期叶酸组分特征,鉴定出 9 种叶酸化合物,发现随谷穗成熟叶酸总含量逐渐下降,其中 5-M-THF 和 10-F-FA 是谷穗主要的叶酸组分。转录组分析结果进一步揭示叶酸合成关键基因表达与叶酸组分代谢相关发现, *ADCS*、*DHFR2* 和 *GGH* 基因是谷穗叶酸积累的关键基因。同时,叶酸合成基因在穗发育期存在着可变剪切的类型可能影响谷穗叶酸代谢,明确了叶酸合成基因 *DHFR1/2* 与一碳代谢及激素信号传导途径基因之间存在的蛋白互作网络。以上结果为进一步研究单子叶植物叶酸积累的分子规律提供了新思路。

附图和附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] Young D W. The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid. *Nat Prod Rep*, 1986, 3: 395–419.
- [2] Chistoserdova L, Vorholt J A, Thauer R K, Lidstrom M E. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science*, 1998, 281: 99–102.
- [3] 胡廷章. 生物体中一碳单位的代谢. 四川三峡学院学报, 1999, (5): 74–77.

- Hu Y Z. The metabolism of one carbon unit living. *J Chongqing Three Gorges Univ*, 1999, (5): 74–77 (in Chinese with English abstract).
- [4] Strum W, Nixon P F, Bertino J B, Bertino H J. Intestinal folate absorption: I. 5-methyltetrahydrofolic acid. *J Invest*, 1971, 50: 1910–1916.
- [5] Shane B. Polyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm*, 1989, 45: 263–335.
- [6] 单齐翼. 糯玉米种质资源评价及籽粒发育过程叶酸合成代谢规律研究. 华南理工大学硕士学位论文, 广东广州, 2019.
- Shan Q J. The Germplasm Evaluation and Folate Synthetic Metabolism during Kernel Development of Waxy Maize. MS Thesis of South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [7] Gorelova V, Bastien O, De Clerck O, Lespinats S, Rébeillé F, Van Der Straeten D. Evolution of folate biosynthesis and metabolism across algae and land plant lineages. *Sci Rep*, 2019, 9: 99–102.
- [8] 张大众, 刘佳佳, 冯佰利. 中国谷子种植利用史及其演进启示. 草业学报, 2018, 27(3): 173–186.
- Zhang D Z, Liu J J, Feng B L. History of foxtail millet planting, husbandry, and societal utilization in China. *Acta Pratacult Sin*, 2018, 27(3): 173–186 (in Chinese with English abstract).
- [9] 郑楠楠, 慕文涛, 王春玲, 贾婷婷, 么杨, 任贵兴. 不同品种谷子营养成分及功能活性成分差异化分析. 粮油食品科技, 2018, 26(2): 34–39.
- Zheng N N, Qi W T, Wang C L, Yun T T, Yao Y, Ren G X. Comparative analysis of nutritional and functional components in different kinds of millet. *Sci Technol Cereals Oils Foods*, 2018, 26(2): 34–39 (in Chinese with English abstract).
- [10] Paul M F. Dietary Reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11: 296–297.
- [11] 邵丽华. 山西省小米叶酸含量的研究. 山西师范大学硕士学位论文, 山西临汾, 2014.
- Shao L H. Study of Folic Acid Content in Millet of Shanxi Province. MS Thesis of Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi, China, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [12] 侯思宇, 宋敏, 闫陆飞, 孙朝霞, 韩渊怀, 李红英. HPLC 法测定谷子籽粒叶酸含量及种质资源评价. 土壤, 2018, 50: 1235–1240.
- Hou S Y, Song M, Yan L F, Sun Z X, Han Y H, Li H Y. Evaluation and detection of folic acid content of seeds among foxtail millet accessions by HPLC method. *Soils*, 2018, 50: 1235–1240 (in Chinese with English abstract).
- [13] Blancaquaert D, Van Daele J, Strobbe S, Kiekens F, Storozhenko S, De Stur H, Gellynck X, Lambert W, Stove C, Van Der Straeten D. Improving folate (vitamin B9) stability in biofortified rice through metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1076–1078.
- [14] Jacob J A. Twenty years after folic acid fortification, FDA ponders expansion to corn masa flour. *JAMA*, 2016, 315: 1821–1822.
- [15] Mahato A, Vyas S, Chatterjee N S. HPLC-UV estimation of folic acid in fortified rice and wheat flour using enzymatic extraction and immunoaffinity chromatography enrichment: an interlaboratory validation study. *J AOAC Int*, 2020, 103: 73–77.

- [16] Storozhenko S, Brouwer D V, Volckaert M, Navarrete O, Blancquaert D, Zhang G F, Lambert W, Van Der Straeten D. Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1277–1279.
- [17] 汪冉冉. 过量表达 *GCHI* 和 *ADCS* 基因对提高植物叶酸含量的研究. 兰州大学硕士学位论文, 甘肃兰州, 2013.
Wang R R. The Study on Enhancing Folate Content in Plants by Overexpression of *GCHI* and *ADCS* Genes. MS Thesis of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, China, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [18] Wan X, Han L D, Yang M, Zhang H Y, Zhang C Y, Hu P. Simultaneous extraction and determination of mono-polyglutamyl folates using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its applications in starchy crops. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 2891–2904.
- [19] Lian T, Guo W Z, Chen M R, Li J L, Liang Q J, Liu F, Meng H Y, Xu B S, Chen J F, Zhang C Y, Jiang L. Genome-wide identification and transcriptional analysis of folate metabolism-related genes in maize kernels. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 1–14.
- [20] 韩娟英, 何曦, 蒋宙蕾, 梅沙, 张宁, 吴殿星. 富含叶酸水稻研究进展. *中国稻米*, 2017, 23(6): 7–12.
Han J Y, He X, Jiang Z L, Mei S, Zhang N, Wu D X. Progress on high folate content rice. *China Rice*, 2017, 23(6): 7–12 (in Chinese with English abstract).
- [21] Blancquaert D, Van Daele J, Storozhenko S, Stove C P, Lambert W, Van Der Straeten D. Rice folate enhancement through metabolic engineering has an impact on rice seed metabolism, but does not affect the expression of the endogenous folate biosynthesis genes. *Plant Mol Biol*, 2013, 83: 329–349.
- [22] Hanson A D, Gregory J F. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 105–125.
- [23] Albani D, Parisi B, Carbonera D, Cella R. Dihydrofolate reductase from *Daucus carota* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic characterization. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 363–372.
- [24] Bachmann B, Follmann H. Deoxyribonucleotide biosynthesis in green algae: characterization of thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in *Scenedesmus obliquus*. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 256: 244–252.
- [25] Gorelova V, De Lepeleire J, Van Daele J, Pluim D, Meï C, Cuypers A, Leroux O, Rébeillé F, Schellens J H, Blancquaert D, Stove C P, Van Der Straeten D. Dihydrofolate reductase/Thymidylate synthase fine-tunes the folate status and controls redox homeostasis in plants. *Plant Cell*, 2017, 29: 2831–2853.
- [26] Kim S E, Cole P D, Cho R C, Ly A, Ishiguro L, Sohn K J, Croxford R, Kamen B A, Kim Y I. γ -glutamyl hydrolase modulation and folate influence chemosensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *British J Cancer*, 2013, 109: 2175–2188.
- [27] Cheng C Y, Krishnakumar V, Chan A P, Thibaud N F, Schobel S, Town C D. Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J*, 2017, 89: 789–804.
- [28] Swarup R, Crespi M, Bennett M J. One gene, many proteins: mapping cell-specific alternative splicing in plants. *Dev Cell*, 2016, 39: 383–385.
- [29] Zhang X, Mount S M. Two alternatively spliced isoforms of the *Arabidopsis* SR45 protein have distinct roles during normal plant development. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1450–1458.
- [30] Airoldi C A, Bergonzi S, Davies B. Single amino acid change alters the ability to specify male or female organ identity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 18898–18902.
- [31] Severing E I, Dijk A D J V, Morabito G, Lange J B, Immink R G H, van Ham R C H J. Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. *PLoS One*, 2012, 7: e30524.
- [32] Chen M X, Zhang K L, Gao B, Yang J A, Tian Y, Das D, Fan D, Dai L, Hao G, Yang G, Zhang J H, Zhu F, Fang Y M. Phylogenetic comparison of 5' splice site determination in central spliceosomal proteins of the U1-70K gene family, in response to developmental cues and stress conditions. *Plant J*, 2020, 103: 357–378.
- [33] González B, Vera P. Folate metabolism interferes with plant immunity through 1C methionine synthase-directed genome-wide DNA methylation enhancement. *Mol Plant*, 2019, 12: 1227–1242.
- [34] John S, Fabrice R, John F. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric*, 2000, 80: 795–824.
- [35] Wang L, Kong D D, Lyu Q, Niu G Q, Han T T, Zhao X C, Meng S L, Cheng Q, Guo S C, Du J, Wu Z L, Wang J Z, Bao F, Hu Y, Pan X J, Xia J C, Yuan D, Han L D, Lian T, Zhang C Y, Wang H Y, He X J, He Y K. Tetrahydrofolate modulates floral transition through epigenetic silencing. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1274–1284.
- [36] Finni W, Basem K, Marion W, Thomas H, Katrin F O, Wilfried S, Philippe S K, Corina V A. Folic acid induces salicylic acid-dependent immunity in *Arabidopsis* and enhances susceptibility to *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Pathol*, 2015, 16: 616–622.
- [37] 肖熙鸥, 林文秋, 李可, 冯雪峰, 李威, 邹华芬, 金辉. 茄子 Enhanced disease susceptibility 1 互作蛋白的初步筛选与分析. *热带作物学报*, 2018, 39: 1580–1584.
Xiao X O, Lin W Q, Li K, Feng X F, Li W, Zou H F, Jin H. Screening and analysis of candidate interactors of enhanced disease susceptibility 1 (SmEDS1) in eggplant. *Chin J Trop Crops*, 2018, 39: 1580–1584 (in Chinese with English abstract).