

• 生物技术与方法 •

代谢组学-转录组学联合分析不同品种柿叶矿物质含量差异

余贤美¹, 王洁¹, 高瑞¹, 龚榜初², 艾呈祥^{1*}

1 山东省果树研究所, 山东 泰安 271000

2 中国林业科学院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400

余贤美, 王洁, 高瑞, 龚榜初, 艾呈祥. 代谢组学-转录组学联合分析不同品种柿叶矿物质含量差异[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2986-3002.

YU Xianmei, WANG Jie, GAO Rui, GONG Bangchu, AI Chengxiang. Integrated metabolomic-transcriptomic analysis of mineral contents from persimmon leaves of different varieties[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2986-3002.

摘 要: 柿叶含有丰富的钙、铁、锰、锌等人体必需的矿质元素, 不同柿树品种, 其柿叶中矿质元素的组成和含量有着明显差异。本研究以‘君迁子’ (*Diospyros Lotus* Linn, DL)为对照, 采用代谢组学-转录组学联合分析, 研究了‘黑柿’ (*Diospyros kaki*. HeiShi, HS)、‘西村早生’ (*Diospyros kaki* Thunb. Nishimurawase, NM)、‘泰富’ (*Diospyros kaki* Thunb. TaiFu, TF)鲜嫩柿叶中矿质元素的含量差异。代谢组学分析显示, 从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中分别获得了 382、391 和 368 个差异代谢产物(differentially accumulated metabolites, DAMs), 其中 229 个为共同 DAMs。经 RNA 测序, 获得了 182 008 个单基因(unigenes), 平均长度为 652 bp, 从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中分别获得了 2 598、3 503 和 3 333 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。经基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析, 分别从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中获得了 9、12 和 12 个与矿物质吸收相关的 DEGs, 其中 6 个为共同 DEGs, 每百万碱基测序的转录本序列每千碱基序列片段数(fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, FPKM)值差异倍数为 1.34–6.15, 经实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证, 其表达趋势均与 RNA 测序结果一致, 相对表达水平差异倍数为 0.26–10.21。转录组学数据分析和 qRT-PCR 验证结果表明, ‘黑柿’鲜嫩柿叶中含有较高含量的矿物质, ‘西村早生’和‘泰富’次之。联合分析显示, 6 个 DEGs 与其代谢产物呈正相关。本研究结果说明, 3 个柿树品种中, ‘黑柿’的鲜嫩柿叶可推荐用于富含矿质元素柿叶茶的制作。

关键词: 柿叶; 矿物质吸收; 转录组学分析; 代谢组学分析; 联合分析

资助项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2023A12); 国家重点研发计划(2019YFD1001204)

This work was supported by the Innovation Project for Agricultural Science and Technology of Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2023A12) and the National Key Research and Development Program of China (2019YFD1001204).

*Corresponding author. E-mail: chengxiang_1975@163.com

Received: 2022-10-24; Accepted: 2023-02-28

Integrated metabolomic-transcriptomic analysis of mineral contents from persimmon leaves of different varieties

YU Xianmei¹, WANG Jie¹, GAO Rui¹, GONG Bangchu², AI Chengxiang^{1*}

¹ Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000, Shandong, China

² Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China

Abstract: Persimmon leaves are rich in mineral elements (such as Ca, Fe, Mn, Zn) which are essential for human body. However, the composition and content of mineral elements are different in different persimmon varieties/cultivars. In this research, an integrated metabolomics-transcriptomic analysis was carried out to investigate the difference in mineral contents from the tender leaves of '*Diospyros kaki*. HeiShi' (HS), '*Diospyros kaki* Thunb. Nishimurawase' (NM) and '*Diospyros kaki* Thunb. TaiFu' (TF), using rootstock '*Diospyros Lotus* Linn' (DL) as the control. The metabolomic analysis showed that 382, 391 and 368 differentially accumulated metabolites (DAMs) were obtained from DL vs. HS, DL vs. NM and DL vs. TF, respectively, and 229 common DAMs were obtained by comparative analysis. By RNA sequencing, 182 008 unigenes with 652 bp of mean length were annotated, and 2 598, 3 503 and 3 333 DEGs were detected from DL vs. HS, DL vs. NM and DL vs. TF, respectively. After gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment, 9, 12 and 12 DEGs involved in mineral absorption were obtained from DL vs. HS, DL vs. NM and DL vs. TF, respectively, among which 6 common DEGs with $|\log_2(\text{fold change})|$ of 1.34–6.15 were selected for qRT-PCR validation. A consistent trend of relative expression level of each DEG with RNA-Seq data was observed, with $|\log_2(\text{fold change})|$ of 0.26–10.21. Based on the transcriptomic analysis and qRT-PCR validation, it was observed that the tender leaves of HS had greater level in mineral absorption, followed by NM and TF. In addition, the positive correlations between the 6 DEGs and their metabolites were observed *via* the conjoint analysis. Thus, the tender leaves of HS could be recommended for the production of persimmon leaf tea rich in minerals.

Keywords: persimmon leaves; mineral absorption; transcriptomic analysis; metabolomics analysis; conjoint analysis

柿树(*Diospyros kaki* L.)起源于中国, 现已普遍种植于温带地区^[1]。柿叶中含有丰富的维生素 C (vitamin C, Vc)、氨基酸、有机酸、钙、铁、锌、磷及其他微量元素等对人体健康有益的营养成分, 长期以来作为传统中草药或功能性饮料用于日常保健^[2-5]。柿叶茶等产品在中国、日本、韩国等亚洲国家越来越受欢迎。

钙、铁、锰、锌、磷等矿物质是对人体有益的必需营养元素。中草药茶中的矿物质含量较高, 不仅从营养的角度吸引消费者, 还能用于评估其质量好坏和饮用之后的潜在益处^[6]。农产品及其土壤中的矿物元素, 是相对稳定的, 可作为产品原产地的地理标志^[7-9]。同时, 品种、地理来源、气候条件、收获季节、生长阶段等

因素及其相互作用,对于茶叶中的矿物质含量及茶叶品质均有着显著影响^[10-11]。

作为功能性饮料,柿叶茶具有广阔的开发应用前景,有必要对其中的功能成分有个比较清晰的了解。然而,对于相同品种不同地理来源或同一地理来源不同品种柿叶茶中矿物质含量差异的研究,均尚未见报道。为探索同一地理来源不同柿树品种柿叶中矿物质含量的差异性,本研究通过代谢组学-转录组学联合分析方法,以柿树常用砧木‘君迁子’(*Diospyros Lotus* Linn, DL)为对照,研究‘黑柿’(*Diospyros kaki*. HeiShi, HS)、“西村早生”(*Diospyros kaki* Thunb. Nishimurawase, NM)和‘泰富’(*Diospyros kaki* Thunb. Taifu, TF)等柿树品种嫩叶中矿物质含量的差异,旨在为富含矿质元素柿叶茶的研制和从柿叶中提取高含量矿物质选择最佳柿树品种提供助力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用的‘君迁子’‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’4个品种的柿叶均采自山东省果树研究所柿树试验基地自然条件下统一栽培管理的健康柿树,从每棵柿树上采集20 g鲜嫩柿叶,每个品种3棵树作为3个生物学重复。

1.2 方 法

1.2.1 代谢组学测序及相关数据分析

样品制备、提取物分析、代谢物的鉴定和定量分析,均由武汉迈特维尔生物科技有限公司(www.metware.cn)严格按照标准程序^[12]进行操作。

样品制备:样品真空冷冻干燥后,研磨至粉末状,取100 mg粉末溶解于1.0 mL提取液中,4 °C冰箱过夜(期间涡旋3次,以提高提取率),10 000×g离心10 min,吸取上清,经

0.22 μm微孔滤膜过滤后保存于进样瓶中。提取物分析:制备好的样品通过高效液相色谱和串联质谱进行分析。代谢物的鉴定:基于迈维自建数据库MWDB (metware database)及代谢物信息公共数据库,根据二级谱信息进行物质定性。代谢物的定量分析:利用三重四级杆质谱的多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行代谢物的定量分析。获得的数据通过软件Analyst v1.6.3 software (AB SCIEX)进行分析。采用多元统计分析进行代谢物的主成分分析(principal component analysis, PCA),通过R软件(www.r-project.org)进行代谢物聚类分析,根据VIP (variable importance in projection)≥1, fold change≥2 或 fold change≤0.5,来确定各比较组的差异累积代谢物(differentially accumulated metabolites, DAMs)。

1.2.2 总 RNA 提取、文库构建、RNA 测序和数据分析

总RNA的提取、cDNA文库的构建和RNA测序,均由武汉迈特维尔生物科技有限公司(www.metware.cn)完成。

采用TRNzol总RNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取样品总RNA,通过分光光度计NanoDrop®ND-1000 (Thermo Scientific)检测RNA浓度和纯度,OD吸收峰比值合格标准为 $A_{260}/A_{280}>1.8$, $A_{260}/A_{230}>1.6$;通过安捷伦生物分析仪Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)和RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies)检测RNA总量和完整性,合格标准为RIN分值>7.0。采用去核糖体试剂盒Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (Plant) for Illumina (New England Biolabs)和NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)试剂盒构建cDNA文库,4个样品各3次重复,共构建12个cDNA文库,利用

Illumina HiSeq™ 4000 system 对构建好的文库进行测序, 测序读长为 2×150 bp。

通过软件 FastQC 对 raw reads 去除接头序列和低质量序列后, 获得 clean reads, 利用软件 Trinity v2.5.1 对 clean reads 进行 *De novo* 组装^[13]。通过软件 featureCounts v1.5.0-P3^[14], 采用每百万碱基测序的转录本序列每千碱基序列片段数 (fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, FPKM) 值^[15]对基因表达水平进行定量分析。通过软件 DESeq2 R package (1.20.0)^[16]进行差异表达分析, 并调整 *P*-value。差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选标准为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$, $P\text{-value} \leq 0.05$ 。利用软件 GSeq R package (v2.28.0)^[17]和 KOBAS software (v2.0)^[18]对 DEGs 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分类和功能注释, 以及京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

1.2.3 DEGs 的 qRT-PCR 验证

为了验证 RNA 测序获得的基因表达谱和

数据组装得到的 DEGs 的准确性, 对 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中同时满足 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 和 $P\text{-value} \leq 0.05$ 的 6 个与矿物质吸收相关的 DEGs 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证, 以转录组测序中提取的总 RNA 为模板, 以 *GAPDH* 为参考基因, 重复 3 次, 引物及其序列见表 1。

1.2.4 代谢组学和转录组学数据的联合分析

计算代谢组数据和转录组数据的均值, 根据代谢物和转录本之间的皮尔森相关性 (Pearson correlation, *r*) 进行联合分析^[19], 利用 Cytoscape v3.6.1 对代谢组和转录组关系进行可视化分析^[20]。

2 结果与分析

2.1 代谢组学分析

通过广泛靶向代谢组学方法对 4 组样品 (各 3 次重复) 进行代谢组学分析后, 检测到了 868 种化合物, 聚集为 22 类。基于代谢物的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 显示,

表 1 六个差异表达基因的 qRT-PCR 引物及其序列

Table 1 qRT-PCR primers and their sequences for the 6 selected DEGs

Gene ID	Predicted function	KEGG pathway	Primer sequences (5'→3')
<i>DN41367_c2_g1</i>	Mineral absorption	ko04978	F: AGCTAAGAAGAGTGGGCAAAG R: GAAGGGAACCAAGACCAGATT
<i>DN25744_c0_g1</i>	Mineral absorption	ko04978	F: CTTTCAACAGCCGCTTATTC R: TACACTCAAGCCCACACATAC
<i>DN35062_c3_g1</i>	Mineral absorption	ko04978	F: TCTATCGCTCGCCAGAAGTA R: TCGGAAACAGAGGATCGAAATAAG
<i>DN45693_c0_g2</i>	Mineral absorption	ko04978	F: GCTTGACCTCTTTCCTTCTT R: CCAACCCTTTACCACTCTTTCT
<i>DN51444_c1_g2</i>	Mineral absorption	ko04978	F: CGGAGCGAGACTGGATAATAAG R: GCTGGAGCTGACCACAAATA
<i>DN51444_c1_g1</i>	Mineral absorption	ko04978	F: TAGGTCAACAGTGCAACATAGAG R: ATGGGATGGATGTCAAGTAACC
<i>GAPDH</i>	Reference gene		F: AGCTCTTCCACCTCTCCAGT R: TGCTAGCTGCACAACCAACT

所有的生物学重复聚在一起(图 1A), 说明代谢组学数据是可靠的。在热图(heatmap)中, 4 个样品聚为两组, ‘君迁子’为单独一组, ‘黑柿’ ‘西村早生’和‘泰富’聚为一组(图 1B), 说明‘君迁子’的代谢物谱明显不同于‘黑柿’ ‘西村早生’和‘泰富’。

2.2 差异累积代谢物的鉴定

经鉴定, 从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中分别获得了 382 个(261 个上调, 121 个下调)、391 个(239 个上调, 152 个下调)和 368 个(253 个上调, 115 个下调) DAMs (图 2A–2C), 其中, 共有 DAMs 为 229 种(图 2D), 与矿物质吸收(mineral absorption)通路相关的独特的化合物(unique compounds)分别为 6、3 和 1 个(表 2)。

2.3 转录组测序数据

构建了 12 个 RNA 文库, 经 RNA 测序, 共获得 779.759 Mb raw reads, 该原始数据存入

NCBI 数据库(PRJNA646845), 数据网址为 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=PRJNA646845>。经净化和质量过滤, 共获得 770.810 Mb clean reads, 包含 115.18 Gb clean bases, 碱基百分比 Q20 和 Q30 分别为 97.18%–97.90%和 92.30%–94.13%。经 trinity 程序组装, 获得 439 550 个 transcripts, 平均长度为 693 bp, 注释了 182 008 个 unigenes, 平均长度为 652 bp。片段长度<500 bp 的 transcripts 和 unigenes 的占比分别为 52.51%和 57.56% (图 3), 说明 RNA 测序数据质量较高, 可用于后续分析。基于 FPKM 值的样品主成分分析显示, 同一样品的所有生物学重复聚在一起(图 4), 表明转录组测序数据是可靠的。

2.4 DEGs 分析

从 DL vs. HS、L vs. NM 和 DL vs. TF 中分别获得了 20 907、21 874 和 21 359 个 transcripts,

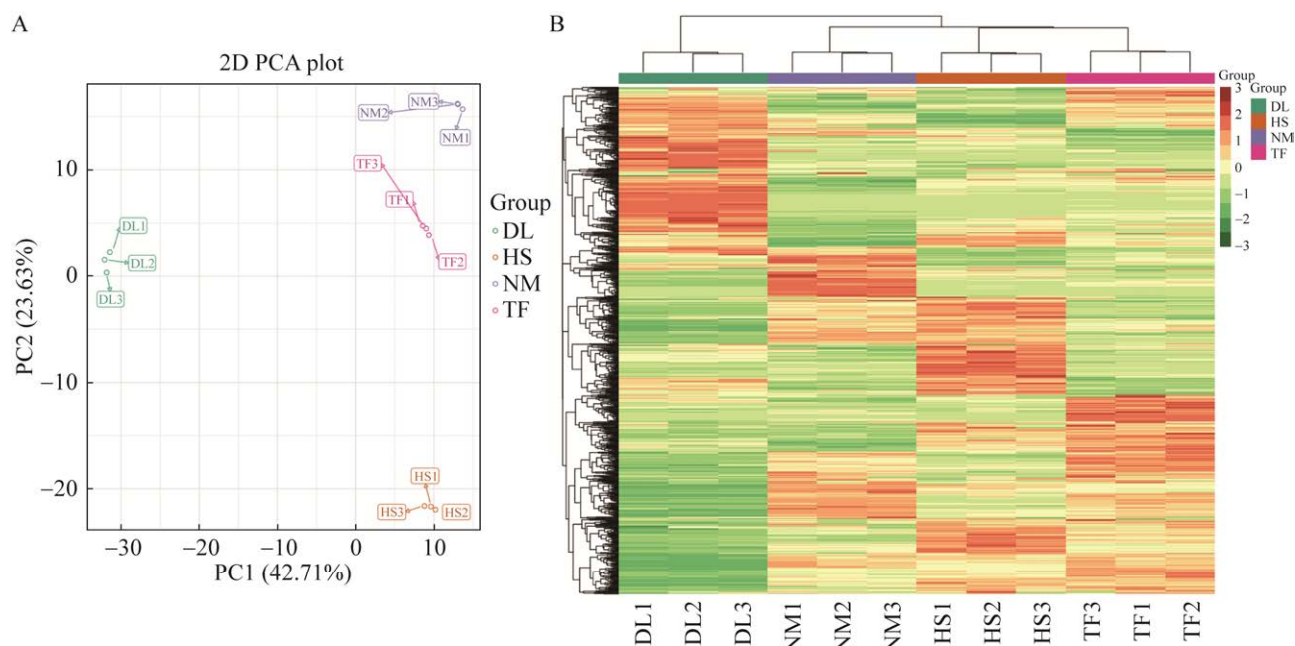


图 1 四组样品的代谢组数据 A: 主成分分析图. B: 代谢物热图

Figure 1 The metabolome profiles of samples of DL, HS, NM and TF. A: PCA plot. B: Heatmap of the metabolites from the four samples.

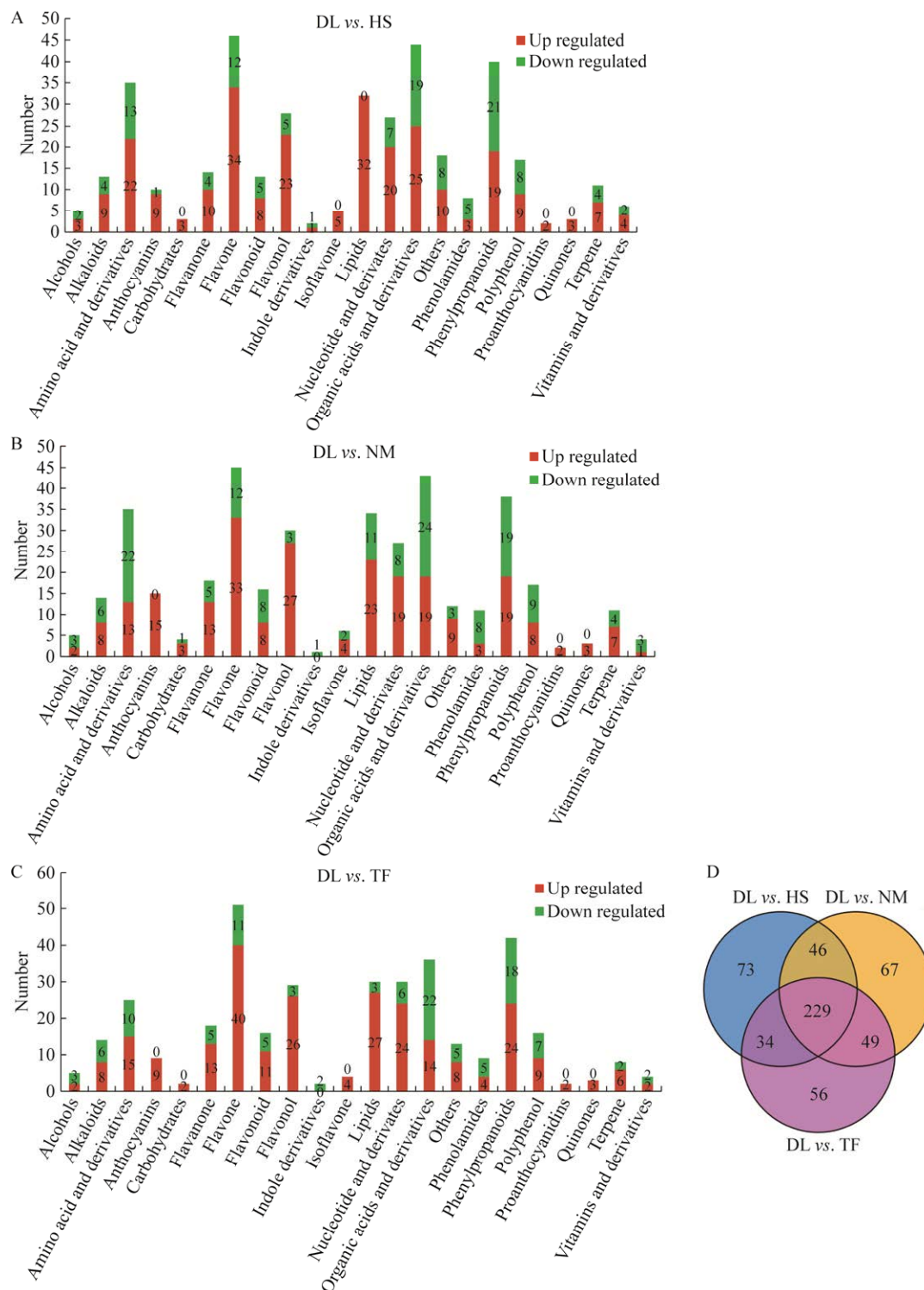


图2 差异代谢产物的鉴定和功能

A-C: DL vs. HS, DL vs. NM 和 DL vs. TF 中的代谢产物. D: 代谢产物韦恩图

Figure 2 Identification and functional characterization of the DAMs. A-C: The metabolites accumulated in the comparison of DL vs. HS, DL vs. NM and DL vs. TF, respectively. D: Venn diagram of the accumulated metabolites.

表 2 与矿物质吸收通路相关的独特的化合物

Table 2 Unique compounds related to the pathway of mineral absorption

Index	KEGG pathway and ko ID	Compounds	Class	Content of the unique compounds				Fold change		
				DL	HS	NM	TF	HS/DL	NM/DL	TF/DL
pme0023	Mineral absorption	L-threonine	Amino acid and derivatives	2.70E+06	5.73E+06	2.25E+06	2.88E+06	2.12**	0.83	1.06
pmb0829	ko04978	Phosphoric acid	Organic acids and derivatives	7.07E+05	2.44E+06	7.82E+05	9.31E+05	3.44**	1.11	1.32
pme1988		L-alanine	Amino acid and derivatives	1.07E+06	2.22E+06	1.62E+06	9.77E+05	2.07**	1.52	0.91
pme0050		L-tryptophan	Amino acid and derivatives	2.20E+07	6.86E+06	6.97E+06	3.95E+06	0.31**	0.32**	0.18**
pme0009		L-serine	Amino acid and derivatives	1.06E+06	3.27E+06	1.84E+06	1.81E+06	3.10**	1.74	1.72
pme0226		L-asparagine	Amino acid and derivatives	6.35E+05	2.73E+05	2.63E+05	3.59E+05	0.43**	0.41**	0.56
pme1210		L-methionine	Amino acid and derivatives	1.01E+06	9.00E+05	2.34E+05	1.77E+06	0.89	0.23**	1.75

** indicate the unique compounds obtained.

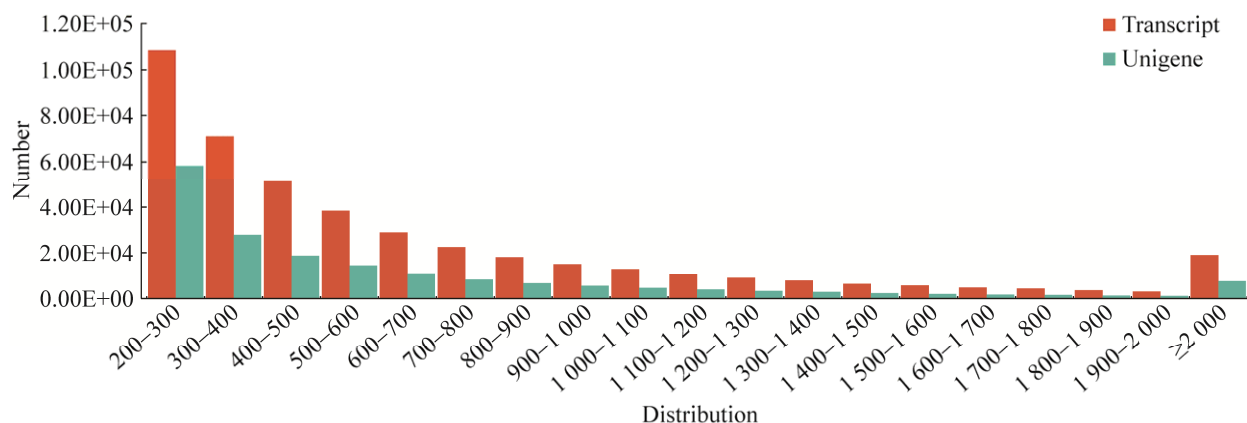


图 3 转录组测序数据长度分布

Figure 3 The length distribution of the transcriptome sequencing data.

其中, 共有 transcripts 为 11 794 个(图 5A)。以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 和 $P\text{-value} < 0.05$ 为筛选标准, 从 DL vs. HS、L vs. NM 和 DL vs. TF 中分别检测出 2 598、3 503 和 3 333 个 DEGs, 其中, 1 370、1 524 和 1 678 个 DEGs 为上调基因, 1 228、1 979 和 1 655 个 DEGs 为下调基因(图 5B)。在 heatmap 中, 4 个样品聚为两组, 其中 DL 为一组, HS、NM 和 TF 聚为一组(图 5C), 该结果与代谢组分

析结果一致, 表明转录组测序数据是可靠的。

经 GO 分类和功能注释, 从 DL vs. HS 获得的 2 598 个 DEGs 被聚为 2 大类, 51 小类, 其中, 1 244 个 DEGs (655 个上调, 589 个下调)被注释为分子功能(molecular function), 1 354 个 DEGs (715 个上调, 639 个下调)被注释为生物学过程(biological process)(图 6A); 从 DL vs. NM 获得的 3 503 个 DEGs 被聚为 3 大类, 59 小类, 其

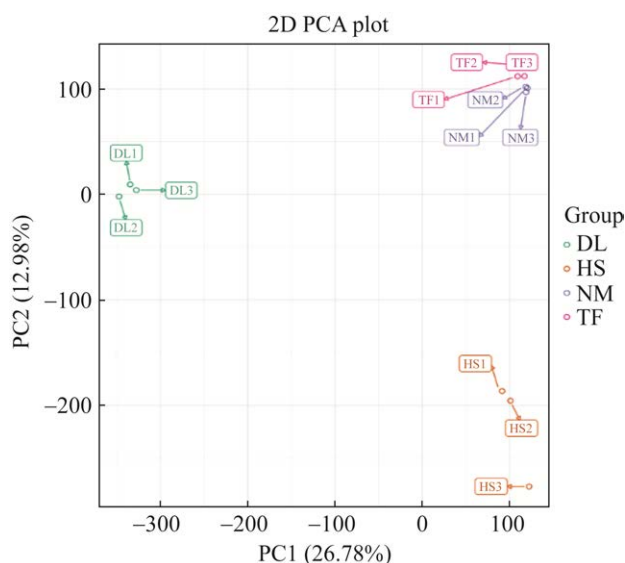


图4 基于转录组测序数据 FPKM 值的主成分分析图

Figure 4 The PCA diagram based on FPKM values of the transcriptome sequencing data.

中, 817 个 DEG (253 个上调, 564 个下调)被注释为细胞组分(cellular component), 1 469 个 DEGs (623 个上调, 846 个下调)被注释为分子功能(molecular function), 1 217 个 DEGs (648 个上调, 569 个下调)被注释为生物学过程(biological process) (图 6B); 从 DL vs. TF 获得的 3 333 个 DEGs 被聚为 3 大类, 63 小类, 其

中, 177 个 DEGs (85 个上调, 92 个下调)被注释为细胞组分(cellular component), 1 387 个 DEGs (675 上调, 712 下调)被注释为分子功能(molecular function), 1 769 个 DEGs (918 个上调, 851 个下调)被注释为生物学过程(biological process) (图 6C)。

KEGG 通路富集分析显示, 高度富集的 DEGs, 其 KEGG 通路为次生代谢产物生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、Toll 和 lmd 信号通路(Toll and lmd signaling pathway)、植物-病原互作(plant-pathogen interaction)、Toll 类受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、异黄酮生物合成(isoflavonoid biosynthesis)和黄酮类化合物生物合成(flavonoid biosynthesis) (图 7)。分别从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中富集到 9、12 和 12 个与矿物质吸收(mineral absorption)通路相关的 DEGs。

2.5 DEGs 的 qRT-PCR 验证结果

经 GO 和 KEGG 富集分析, 获得了 6 个同时在 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中满足筛选标准 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 和 $P\text{-value} < 0.05$, 与矿物质吸收相关的 DEGs (图 8A、8B)。6 个 DEGs 中, 来自‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’柿叶中的

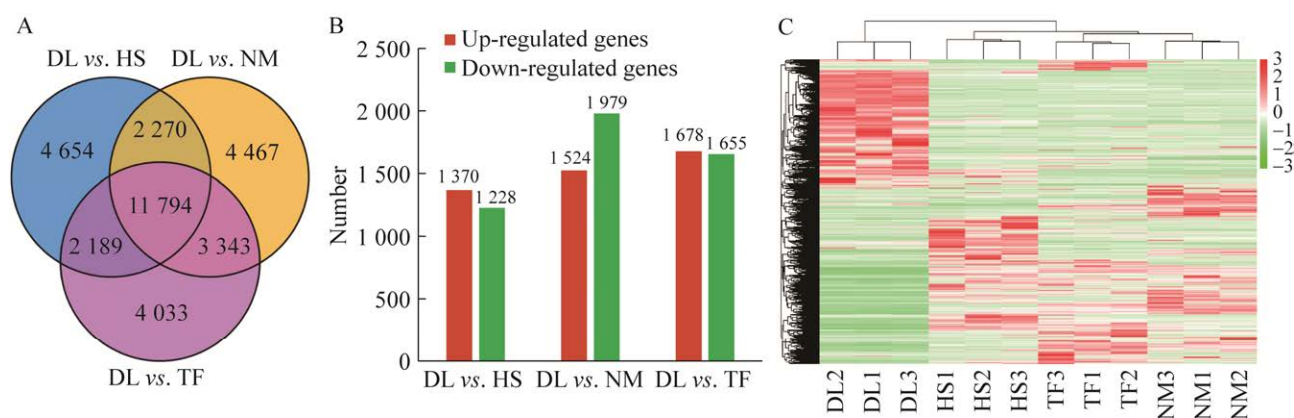
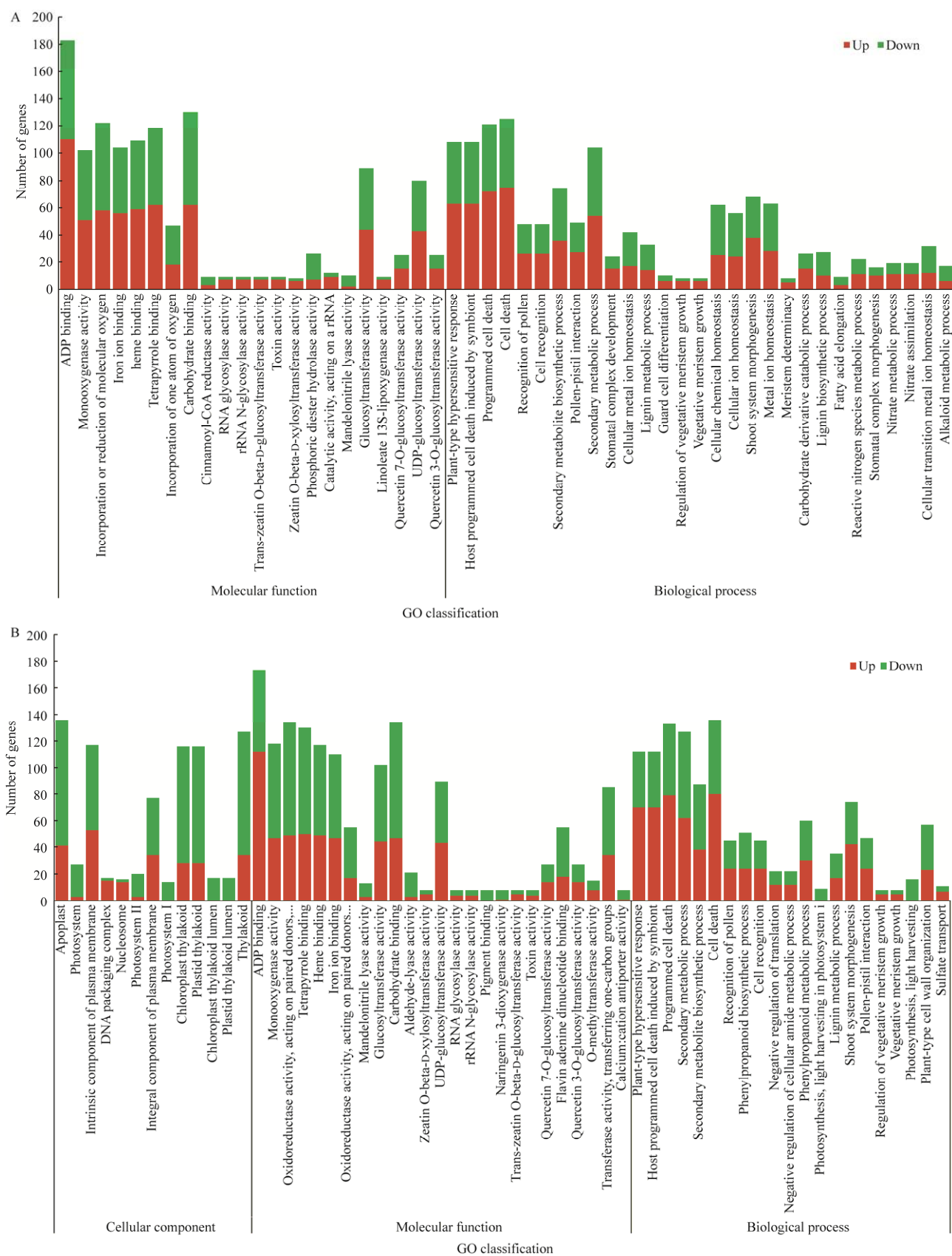


图5 差异表达基因 A: 韦恩图. B: 上调/下调差异表达基因. C: 差异表达基因聚类热图

Figure 5 Differentially expressed genes (DEGs). A: Venn diagrams. B: Up/down regulated DEGs. C: Heatmap of the DEGs.



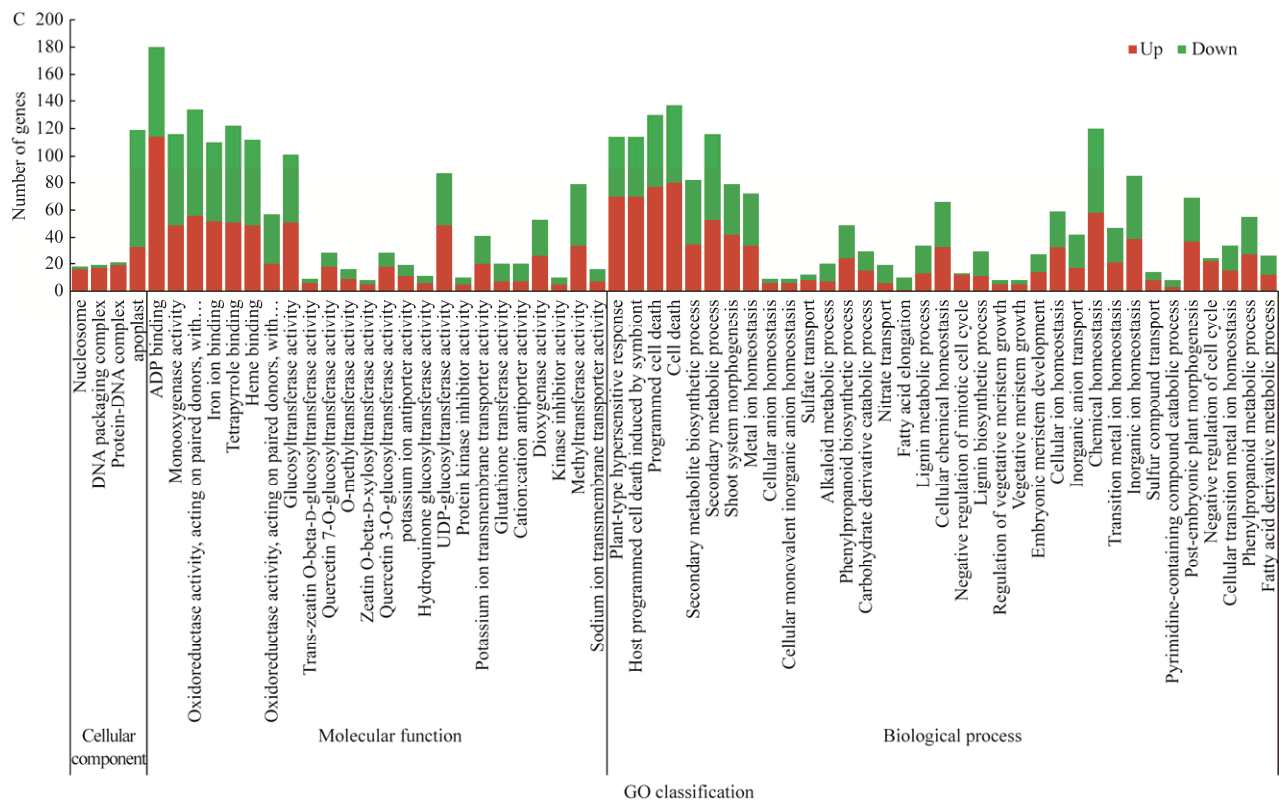
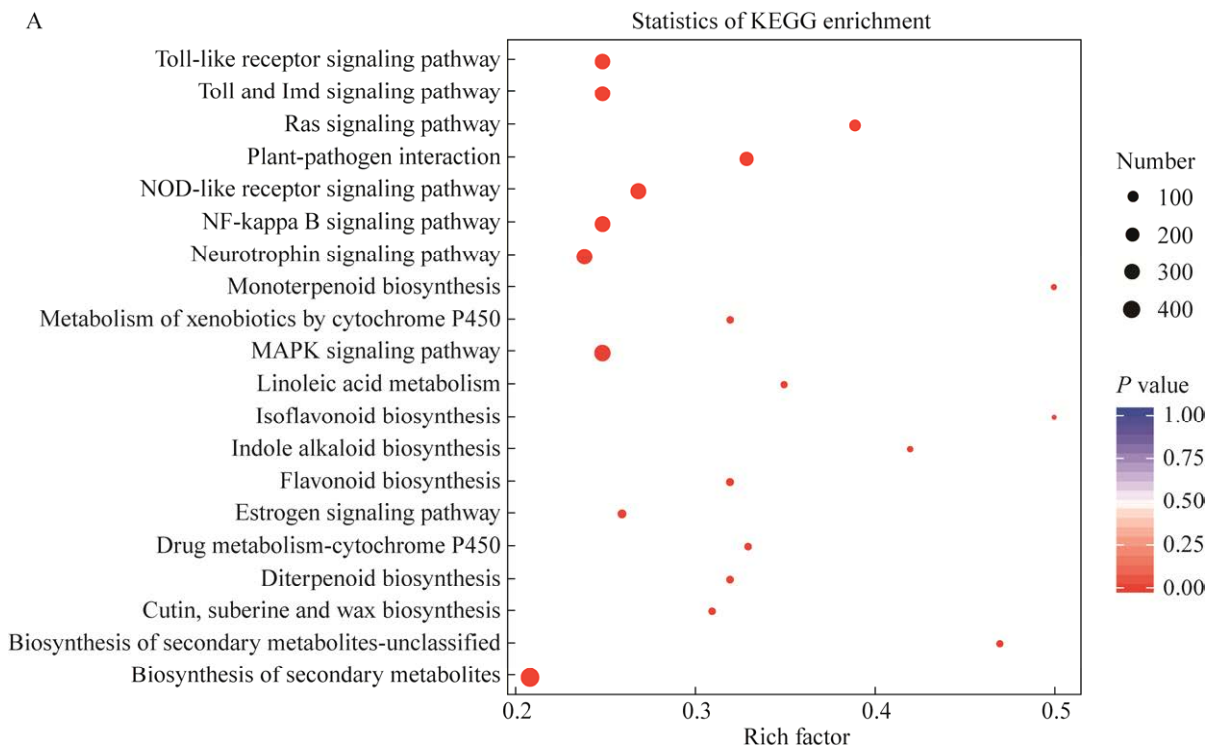


图 6 差异表达基因的 GO 富集分析

Figure 6 GO enrichment of DEGs. A: DL vs. HS. B: DL vs. NM. C: DL vs. TF.



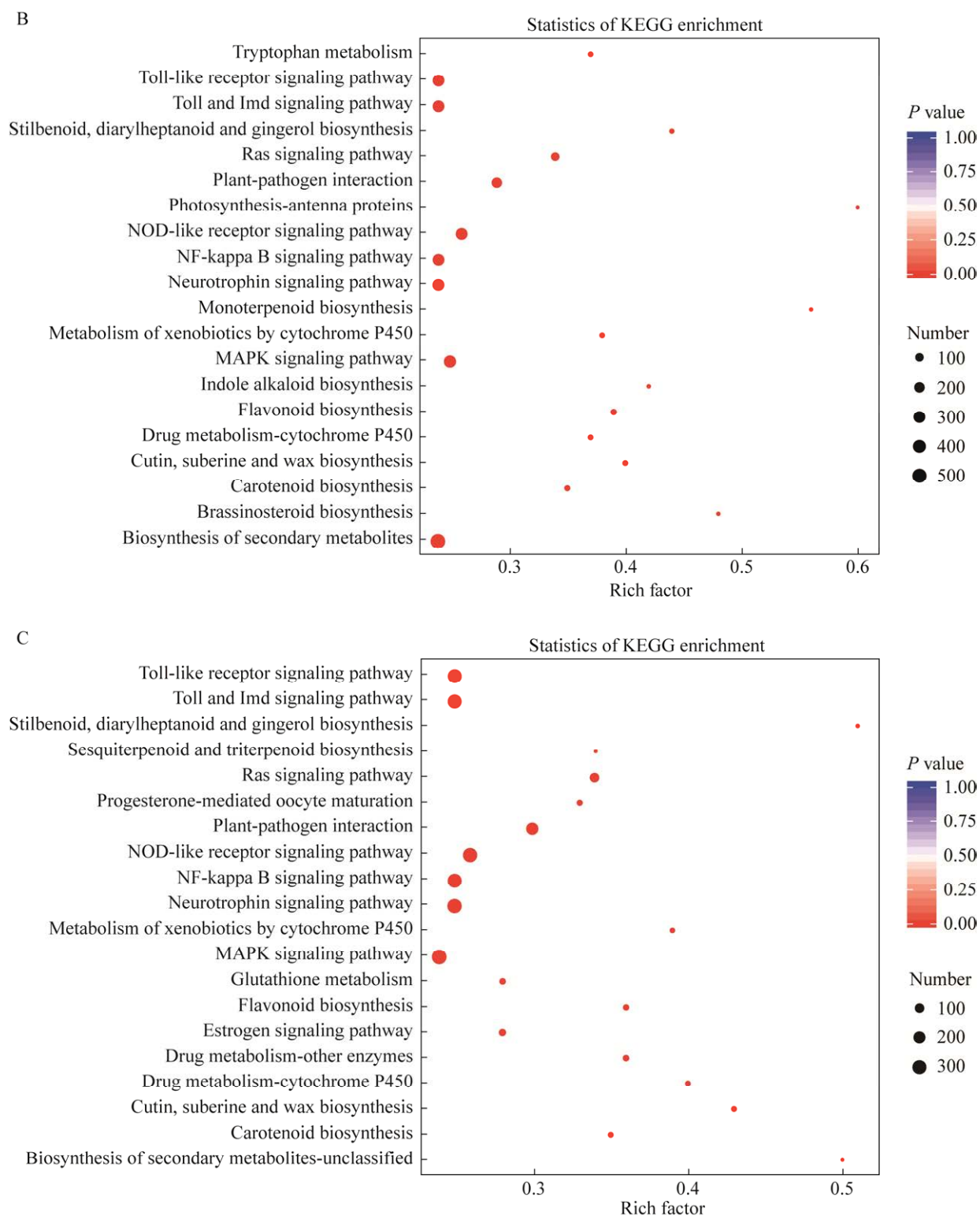


图 7 差异表达基因 KEGG 富集分析

Figure 7 KEGG enrichment of the DEGs. A: DL vs. HS. B: DL vs. NM. C: DL vs. TF.

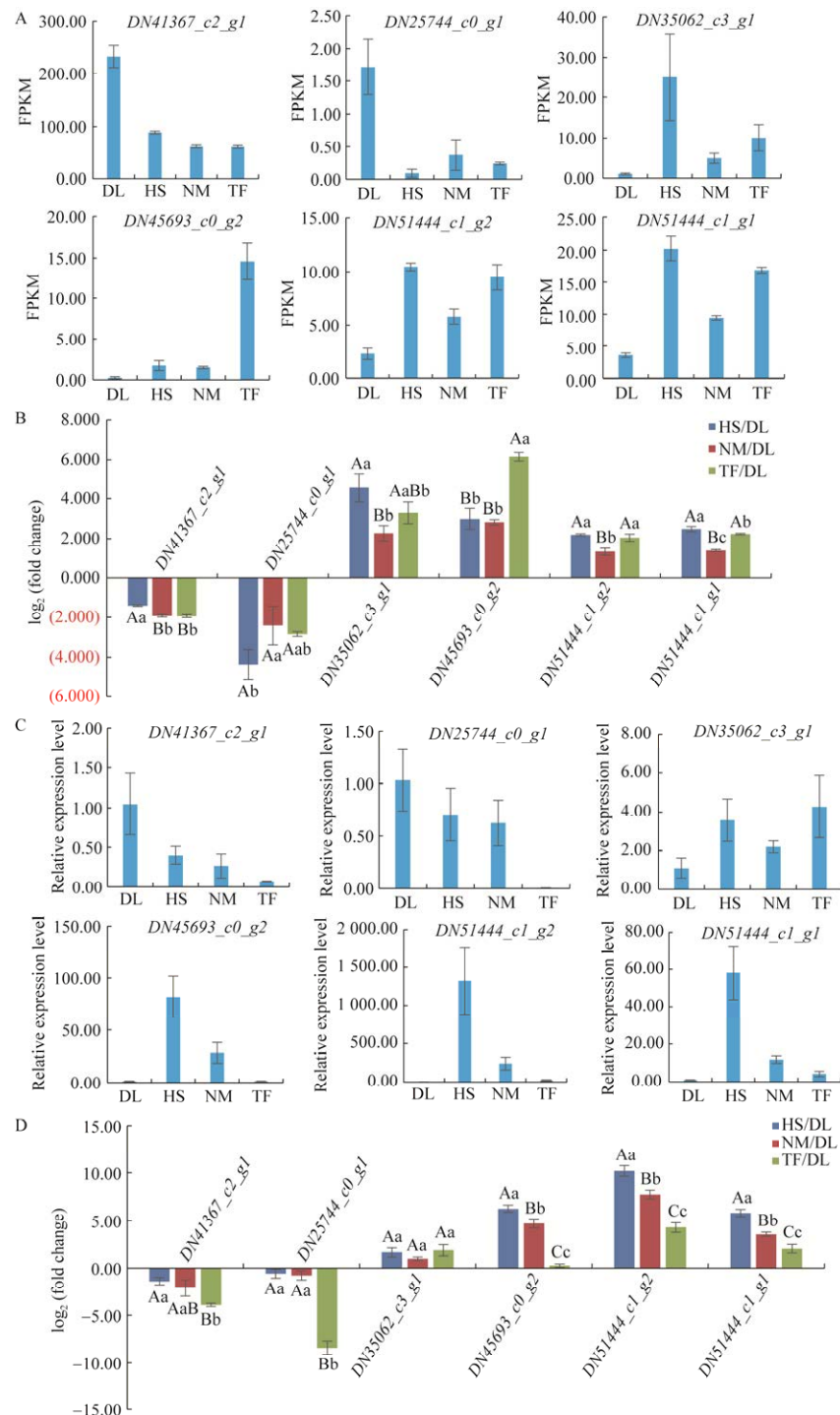


图8 差异表达基因表达情况 A: 转录组测序数据中的 DEGs. B: 转录组测序数据中 DEGs 的 FPKM 值差异倍数. C: DEGs 相对表达水平. D: DEGs 相对表达水平的差异倍数

Figure 8 Differentially expressed genes (DEGs) in HS, HM and TF compared with DL. A: DEGs from RNA-Seq data. B: log₂ (fold change) of the FPKM for the DEGs from RNA-Seq data. C: Relative expression level of the DEGs. D: log₂ (fold change) of the relative expression level for the DEGs. The data with different uppercase letters and different lowercase letters indicate differences at the 0.01 level and 0.05 level, respectively.

DN35062_c3_g1、*DN45693_c0_g2*、*DN51444_c1_g2* 和 *DN51444_c1_g1* 等 4 个 DEGs, 其 FPKM 值高于‘君迁子’, 差异倍数大于 2, 而来自‘君迁子’的 *DN41367_c2_g1* 和 *DN25744_c0_g1* 这 2 个 DEGs, 其 FPKM 值高于‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’, 但差异倍数小于 2 (图 8A), 6 个 DEGs 的 FPKM 值差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})|$ 为 1.34–6.15 (图 8B)。

qRT-PCR 验证结果显示, 6 个 DEGs 中, 来自‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’柿叶的 *DN35062_c3_g1*、*DN45693_c0_g2*、*DN51444_c1_g2* 和 *DN51444_c1_g1* 等 4 个 DEGs, 其相对表达水平平均高于‘君迁子’, 而 *DN41367_c2_g1* 和 *DN25744_c0_g1* 这 2 个 DEGs 的相对表达水平低于‘君迁子’ (图 8C), 6 个 DEGs 的相对表达水平差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})|$ 为 0.26–10.21 (图 8D), 该结果与 RNA 测序分析结果一致, 说明 RNA 测序和 qRT-PCR 验证的结果均是可靠的。

2.6 代谢组学和转录组学数据联合分析

基于转录组学测序数据和代谢组学测序数据联合分析的主成分分析结果显示, 2D 主成分分析图(图 9A)和 3D 主成分分析图(图 9B)中, 每个样品的 3 个生物学重复均聚在一起, 与转录组学测序数据和代谢组学测序数据单独分析的主成分分析结果一致, 说明转录组学测序数据和代谢组学测序数据均是可靠的。6 个目标 DEGs 中, 皮尔森相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC)均 ≥ 0.8 (表 3), 且均聚在 cor 热图(cor heatmap)中(图 9C)。在九象限图中, 6 个 DEGs 均位于第 3 或第 7 象限(图 9D, 表 3), 说明所有的目标 DEGs 与其代谢产物均呈正相关关系。

3 讨论

近年来, 代谢组学-转录组学联合分析被广

泛应用于植物次生代谢产物含量及其与相对应的差异表达基因之间的关系研究^[21-24]。农产品及其土壤中的矿质元素, 是相对稳定的, 可作为农产品原产地的地理标志, 也可用于评估农产品的质量^[6-9], 诸多影响因素中, 品种对于茶叶等农产品中矿物质含量及其品质的影响较大^[10-11]。Tardugno 等^[9]研究了来自不同产地柿果中的矿物质组成, 结果表明不同产地的柿果中, 其矿物质谱差异较大。目前, 对于来自同一区域的不同品种柿树中矿物质组成和含量的研究, 尚未见报道。

本研究以‘君迁子’为对照, 通过代谢组学-转录组学联合分析, 研究了‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’3 个品种鲜嫩柿叶中的矿物质含量差异。代谢组学分析结果显示, 矿物质虽未高度富集, 但从 DL vs. HS、DL vs. NM 和 DL vs. TF 中分别获得了 6、3 和 1 个与矿物质吸收(mineral absorption)通路相关的 unique compounds。经 RNA 测序分析, 获得了 6 个与矿物质吸收相关的共同 DEGs, 差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})|$ 为 1.34–6.15 (图 8B), qRT-PCR 验证显示, 6 个 DEGs 的相对表达水平与测序数据趋势一致, 差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})|$ 为 0.26–10.21 (图 8D)。

从 RNA 测序数据来看, 6 个 DEGs 中, 来自 DL vs. NM 的 *DN25744_c0_g1* 其 FPKM 值显著高于 DL vs. HS, *DN41367_c2_g1*、*DN35062_c3_g1*、*DN51444_c1_g2* 和 *DN51444_c1_g1* 等 4 个 DEGs 显著低于 DL vs. HS, 而 *DN45693_c0_g2* 与 DL vs. HS 无明显差异; 来自 DL vs. TF 的 *DN25744_c0_g1* 和 *DN45693_c0_g2* 这 2 个 DEGs 其 FPKM 值显著高于 DL vs. HS, *DN41367_c2_g1*、*DN35062_c3_g1* 和 *DN51444_c1_g1* 等 3 个 DEGs 显著低于 DL vs. HS, 而 *DN51444_c1_g2* 与 DL vs. HS 无明显差异。这些结果表明, ‘西村早生’和‘泰富’柿叶中与矿物

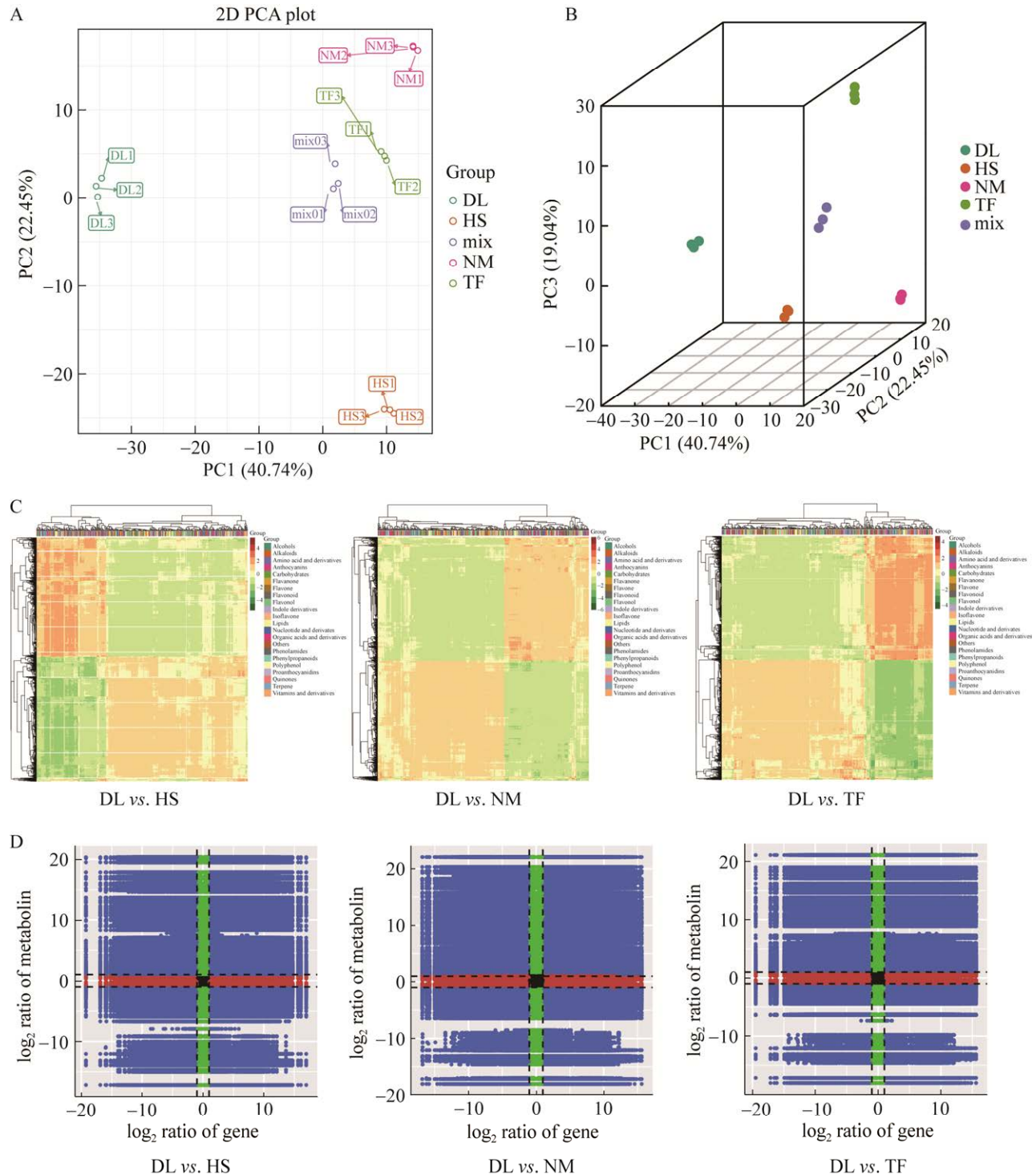


图9 转录组学测序数据和代谢组学测序数据联合分析 A: 二维主成分分析图. B: 三维主成分分析图. C: Cor 热图. D: 九象限图

Figure 9 Conjoint analysis of RNA-Seq data and metabolome profile. A: 2D PCA plot. B: 3D PCA plot. C: The cor heatmap. D: The ninequadrants diagram.

表3 差异表达基因与差异代谢产物九象限分析数据

Table 3 The ninequadrant data of DEGs and DAMs

	Gene ID	Log ₂ FC	Meta ID	Log ₂ FC	PCC	Ninequadrants
DL vs. HS	<i>DN41367_c2_g1</i>	-1.407 40	pme0050	-1.679 74	0.941	7
	<i>DN41367_c2_g1</i>	-1.407 40	pme0226	-1.219 62	0.858	7
	<i>DN25744_c0_g1</i>	-4.818 74	pme0050	-1.679 74	0.859	7
	<i>DN35062_c3_g1</i>	4.628 25	pme0009	1.631 24	0.921	3
	<i>DN35062_c3_g1</i>	4.628 25	pmb0829	1.784 45	0.849	3
	<i>DN45693_c0_g2</i>	3.140 99	pme1988	1.050 78	0.852	3
	<i>DN45693_c0_g2</i>	3.140 99	pme0023	1.082 96	0.888	3
	<i>DN51444_c1_g2</i>	2.211 53	pme0009	1.631 24	0.868	3
	<i>DN51444_c1_g1</i>	2.484 34	pme0009	1.631 24	0.893	3
DL vs. NM	<i>DN41367_c2_g1</i>	-1.941 50	pme0050	-1.655 40	0.941	7
	<i>DN41367_c2_g1</i>	-1.941 50	pme0226	-1.271 69	0.858	7
	<i>DN25744_c0_g1</i>	-2.169 97	pme1210	-2.109 62	0.825	7
DL vs. TF	<i>DN41367_c2_g1</i>	-1.939 49	pme0050	-2.475 39	0.941	7

质吸收相关的基因,其整体表达水平低于‘黑柿’,说明3个品种中,‘黑柿’鲜嫩柿叶中与矿物质吸收相关的基因表达水平最高。

联合分析结果显示,6个DEGs均位于九象限图的第3或第7象限,表明这6个DEGs与其代谢产物呈正相关关系,说明代谢组和转录组的数据及分析结果均是可靠的。从具体的联合分析数据看(表3),DL vs. HS、DL vs. NM和DL vs. TF中,*DN41367_c2_g1*与其差异代谢产物色氨酸(pme0050)均呈显著差异,log₂FC小于1,位于第7象限,说明,‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’鲜嫩柿叶中色氨酸含量均显著低于对照‘君迁子’;‘西村早生’中,天冬酰胺(pme0226)和蛋氨酸(pme1210)的含量也显著低于对照‘君迁子’。仅DL vs. HS中,*DN35062_c3_g1*与其相应的差异代谢产物丝氨酸(pme0009)和磷酸(pmb0829),*DN45693_c0_g2*与其相应的差异代谢产物丙氨酸(pme1988)和苏氨酸(pme0023),以及*DN51444_c1_g2*和*DN51444_c1_g1*与其相应的差异代谢产物丝氨酸(pme0009),其log₂FC大于1,位于第3象限,说明,‘黑柿’的鲜嫩柿

叶中,丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和磷酸的含量显著高于对照‘君迁子’。

4 结论

本研究通过代谢组学-转录组学联合分析,研究了‘黑柿’‘西村早生’和‘泰富’3个品种鲜嫩柿叶的矿物质含量差异,结果显示,‘黑柿’鲜嫩柿叶在矿物质吸收方面表达水平最高,相应的矿物质含量最高,以丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和磷酸为主,‘西村早生’和‘泰富’柿叶次之。因此,‘黑柿’的鲜嫩柿叶可推荐用于制作富含丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和磷酸等矿质元素的柿叶茶或用于提取人体所需的丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和磷酸等矿物质。

REFERENCES

- [1] MIRAEI ASHTIANI SH, SALARIKIA A, GOLZARIAN MR, EMADI B. Non-destructive estimation of mechanical and chemical properties of persimmons by ultrasonic spectroscopy[J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(7): 1522-1534.
- [2] 林娇芬. 富含多种功效成分的柿叶保健茶的研究[D].

- 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2005.
- LIN JF. A study of persimmon leaves' tea with abundant active components[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2005 (in Chinese).
- [3] 郝晴晴. 不同品种、季节柿叶茶品质分析及适制工艺初探[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2014.
- HAO QQ. Quality analysis on persimmon leaf tea of different varieties and seasons and study on the optimal processing technology[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [4] CHANG YL, LIN JT, LIN HL, LIAO PL, WU PJ, YANG DJ. Phenolic compositions and antioxidant properties of leaves of eight persimmon varieties harvested in different periods[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 74-83.
- [5] KIM KA, LEE CH, KANG TK, YANG SJ, LEE CY, LEE WB, JUNG SH. Effect of persimmon leaves (*Diospyros kaki*) on goblet cell density and inflammation in experimental dry eye model[J]. Applied Biological Chemistry, 2020, 63(1): 276-283.
- [6] BHAT R, KIRAN K, ARUN AB, KARIM AA. Determination of mineral composition and heavy metal content of some nutraceutically valued plant products[J]. Food Analytical Methods, 2010, 3: 181-187.
- [7] ZHAO HY, ZHANG SL, ZHANG ZW. Relationship between multi-element composition in tea leaves and in provenance soils for geographical traceability[J]. Food Control, 2017, 76: 82-87.
- [8] LI L, WEN B, ZHANG XL, ZHAO Y, DUAN Y, SONG XF, REN S, WANG YH, FANG WP, ZHU XJ. Geographical origin traceability of tea based on multi-element spatial distribution and the relationship with soil in district scale[J]. Food Control, 2018, 90: 18-28.
- [9] TARDUGNO R, GERVASI T, NAVA V, CAMMILLERI G, FERRANTELLI V, CICERO N. Nutritional and mineral composition of persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) from central and southern Italy[J]. Natural Product Research, 2022, 36(20): 5168-5173.
- [10] ZHAO HY, YU CD, LI M. Effects of geographical origin, variety, season and their interactions on minerals in tea for traceability[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 63: 15-20.
- [11] JIA SS, WANG Y, HU JH, DING ZT, LIANG Q, ZHANG YF, WANG H. Mineral and metabolic profiles in tea leaves and flowers during flower development[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 106: 316-326.
- [12] ZHANGXY, JIANG XL, HE YQ, LI LY, XU P, SUN ZT, LI JM, XU JM, XIA T, HONG GJ. AtHB2, a class II HD-ZIP protein, negatively regulates the expression of *CsANS*, which encodes a key enzyme in *Camellia sinensis* catechin biosynthesis[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 166(4): 936-945.
- [13] GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X, FAN L, RAYCHOWDHURY R, ZENG QD, CHEN ZH, MAUCELI E, HACOEN N, GNIRKE A, RHIND N, di PALMA F, BIRREN BW, NUSBAUM C, LINDBLAD-TOH K, FRIEDMAN N, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.
- [14] LIAO Y, SMYTH GK, SHI W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. Bioinformatics, 2014, 30(7): 923-930.
- [15] TRAPNELL C, WILLIAMS BA, PERTEA G, MORTAZAVI A, KWAN G, van BAREN MJ, SALZBERG SL, WOLD BJ, PACHTER L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515.
- [16] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15: 1-21.
- [17] YOUNG MD, WAKEFIELD MJ, SMYTH GK, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11(2): 1-12.
- [18] WU JM, MAO XZ, CAI T, LUO JC, WEI LP. KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl_2): W720-W724.
- [19] CHO K, CHO KS, SOHN HB, HA IJ, HONG SY, LEE H, KIM YM, NAM MH. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation[J]. Journal of Experimental

- Botany, 2016, 67(5): 1519-1533.
- [20] SU G, MORRIS JH, DEMCHAK B, BADER GD. Biological network exploration with cytoscape 3[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2014, 47(1): 8.13.1-8.13.24.
- [21] ZHANG Z, TIAN CP, ZHANG Y, LI C, LI X, YU Q, WANG S, WANG XY, CHEN XS, FENG SQ. Transcriptomic and metabolomic analysis provides insights into anthocyanin and procyanidin accumulation in pear[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 129.
- [22] WAN HL, ZHANG XL, WANG P, QIU HJ, GUO YF, CHENG YJ, WEN WW. Integrated multi-omics analysis of developing 'Newhall' orange and its glossy mutant provide insights into citrus fragrance formation[J]. Horticultural Plant Journal, 2022, 8(4): 435-449.
- [23] WANG FY, WU YL, WU W, HUANG YJ, ZHU CY, ZHANG RM, CHEN JZ, ZENG JW. Integrative analysis of metabolome and transcriptome profiles provides insight into the fruit pericarp pigmentation disorder caused by 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' infection[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 1-16.
- [24] ZHOU CZ, ZHU C, TIAN CY, XU K, HUANG LJ, SHI BY, LAI ZX, LIN YL, GUO YQ. Integrated volatile metabolome, multi-flux full-length sequencing, and transcriptome analyses provide insights into the aroma formation of postharvest jasmine (*Jasminum sambac*) during flowering[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 183: 111726.

(本文责编 陈宏宇)