

麻竹笋转录组测序及苦涩味物质合成基因 差异表达分析

李露双¹, 董文慧¹, 丁兴萃^{1*}, 章志远², 孙春娃¹, 蔡函江¹

(1. 国家林业局竹子研究开发中心, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江人文园林股份有限公司, 浙江 杭州 310012)

摘要: [目的] 研究避光处理对麻竹笋苦涩味物质合成相关基因表达的影响。[方法] 利用 Illumina HiSeq™ 2500 平台对自然生长(CK)和覆土处理(EP)2种类型的麻竹笋进行转录组测序,并对差异表达基因进行分析。[结果] 转录组测序共获得 36.45 Gb 原始数据,经组装去冗余处理得到 53 388 个 Unigene,将所得 Unigene 比对到 Nr、Pfam、COG、Swissprot、GO 和 KEGG 数据库中进行功能注释,发现共有 31 462 条 Unigene 与其它物种的基因具有同源性。对 CK 和 EP 处理所测得的 Unigene 进行表达量的比较分析,筛选出 1 846 个差异基因,其中,在 EP 处理中上调表达基因 998 个,下调表达基因 848 个。由 KEGG 代谢通路分析发现,差异基因显著地富集在 32 个代谢途径中,其中,包含与苦涩味物质合成相关的糖酵解途径、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成途径等。进一步研究发现,参与麻竹笋芳香族氨基酸、单宁合成的 PFK、ENO、PPY-AT/HPP-AT、LAR 等酶基因在 EP 处理中表达量下降,荧光定量 PCR 验证结果与测序结果基本一致。[结论] 避光处理抑制了苯丙氨酸、酪氨酸、单宁生物合成关键酶基因的表达,可能最终影响麻竹笋苦涩味物质的合成。

关键词: 麻竹笋;避光;转录组测序;苦涩味物质;差异表达基因

中图分类号:S718.46;S795.5

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2018)04-0038-09

Transcriptome Sequencing and Differential Expression Analysis of Bitter and Astringent Substances Biosynthesis Related Gene in *Dendrocalamus latiflorus*

LI Lu-shuang¹, DONG Wen-hui¹, DING Xing-cui¹, ZHANG Zhi-yuan², SUN Chun-wa¹, CAI Han-jiang¹

(1. China National Bamboo Research Center, Hangzhou 310012, Zhejiang, China;

2. Zhejiang Humanities Landscape Co. Ltd, Hangzhou 310012, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] To reveal the effect of avoiding light treatment on the expression of genes related to the synthesis of bitter and astringent substances in *Dendrocalamus latiflorus* shoot. [Method] Transcriptome sequencing was carried out on bamboo shoots with natural growth (CK) and soil covered conditions (EP) by using Illumina HiSeq™ 2500 platform, and the differential expression genes were analyzed. [Result] Transcriptome sequencing produced a total of 36.45 Gb raw data, and then was assembled into 53 388 Unigene by redundant processing. Comparing the obtained Unigene to Nr, Pfam, COG, Swissprot, GO and KEGG, the function annotation showed that a total of 31 462 Unigene were homologous to other species. In the comparative analysis of the Unigene expression in CK and EP experiment, 1 846 differential expression genes were screened out, among which 998 genes were up-regulated and 848 genes were down-regulated in EP experiment. The KEGG results showed that the differential expression genes were significantly enriched into 32 pathways, which included glycolysis, phenylalanine, tyrosine

收稿日期:2018-01-02

基金项目:科技部对发展中国家科技援助项目“中国向巴西提供竹子培育与高效利用技术”(KY201502001)

作者简介:李露双(1992—),女,河南许昌人,硕士研究生,主要研究方向为竹笋品质和竹林培育。

* 通讯作者:丁兴萃,男,研究员,主要研究方向为植物生理生化和竹林培育. E-mail:dxc01@hotmail.com

and tryptophan biosynthesis associated with the synthesis of bitter and astringent substances. Further studies showed that the expression of *PFK*, *ENO*, *PPY-AT/HPP-AT*, *LAR* enzyme genes involved in the synthesis of aromatic amino acids and tannins in *D. latiflorus* shoots decreased in EP treatment, and the results of qRT-PCR were generally consistent with the results of sequencing. [**Conclusion**] Avoiding light treatment can inhibit the gene expression of key enzymes of phenylalanine, tyrosine and tannin biosynthesis, which may ultimately affect the synthesis of bitter and astringent substances in *D. latiflorus* shoots.

Keywords: *Dendrocalamus latiflorus*; avoiding light treatment; transcriptome; bitterness and astringency; differential expressed gene

麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) 为禾本科 (Graminales) 竹亚科 (Bambusoideae) 牡竹属 (*Dendrocalamus* Nees) 大型丛生竹种, 广泛分布于我国亚热带和热带地区, 是重要的笋用竹种^[1]。麻竹笋中含有大量矿物质、维生素和微量元素, 是一种高蛋白、高纤维、低糖低脂的绿色保健食品^[2], 但麻竹笋在自然生长过程中见光会出现味苦涩、口感差、食用性下降等现象, 而避光处理后麻竹笋的苦涩味物质如单宁^[3]、芳香族氨基酸^[4]等苦味物质含量降低, 口感质量得到改善。

植物单宁属多酚类黄酮的一种, 根据结构特征分为缩合单宁和水解单宁两大类, 其最重要的特征是收敛性或涩性, 这一性质与果蔬类产品的可食用性直接相关。植物类黄酮生物合成步骤主要包括公共苯丙烷途径、核心类黄酮-花青素途径、PA 特异途径等^[5-7], 其中, *LAR* 和 *ANR* 被认为是植物中单宁生物合成途径后期的关键酶^[8-9]。Tanner 等^[10]最早在金钱草 (*Lysimachia christinae* Hance) 中克隆了 *LAR* 基因, 发现其基因编码蛋白可催化产生儿茶素, 证明 *LAR* 是单宁生物合成途径中一个重要的限速酶。Lepiniec 等^[6]发现拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中的 *ANR* 基因编码 342 个氨基酸, 可将花青素还原为单宁前体之一的表儿茶素。植物中芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸, 是斑苦竹笋^[11] (*Pleioblastus maculatus* (McClure) C. D. Chu et C. S. Chao)、绿竹笋^[12] (*Dendrocalamus oldhami* Munro) 呈现苦味的原因之一。芳香族氨基酸的生物合成步骤主要包括莽草酸途径和后分支酸途径^[13-14], 目前已在大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers)^[15]、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)^[16-17] 等物种作了初步的研究。如 Johansson 等^[14]发现, 野生型大肠杆菌有 2 个莽草酸激酶同工酶, 分别由基因 *aroK* 和 *aroL* 编码, 敲除 *aroL* 基因后莽草酸酶活性变得微弱, 但莽草酸仍然可以积累, 且

自身仍可合成芳香族氨基酸。

转录组学是继基因组学后发展起来的一门学科, 主要研究生物体某些特定组织或细胞在特定生长状态下基因表达产生的转录产物^[18], 其可作为研究物种基因功能及结构的基础和出发点^[19]。近年来, 转录组测序技术得到了迅速发展, 已广泛应用于多个非模式生物的研究, 在竹类植物中也取得了一定的进展。如王身昌等^[20]利用转录组测序技术筛选得出梁山慈竹 (*D. farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H. L. Fung) 木质素和纤维素合成相关基因, Peng 等^[21]对 6 个不同生长高度的毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.) 笋混合样品进行转录组测序, 鉴定出与植物激素、细胞壁代谢相关基因, Liu 等^[22]利用 Illumina 平台对麻竹不同组织的混合材料进行转录组从头测序分析, 预测得出与木质素合成相关候选基因。已有报道表明, 竹类植物的转录组学研究多集中在细胞壁生物合成 (木质素、纤维素等) 调控方面, 但针对竹笋苦涩味物质生物合成方面的研究却未见报道。本试验通过转录组高通量测序技术, 对自然生长 (CK) 和覆土处理 (EP) 的麻竹笋进行差异表达基因的分析, 筛选出麻竹笋中苦涩物质合成的相关基因, 为麻竹笋苦涩物质合成机制的研究、相关基因的克隆以及功能分析等提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验处理及样品采集

试验地位于福建省漳州市程溪镇的人工笋用林, 该竹林是通过竹荪栽植、压条埋秆等无性繁殖方式逐渐营造成林, 其遗传物质来源于同一原始母竹, 保证了所采竹笋基因型相同。试验设置 2 个处理: EP 处理, 对即将出土的竹笋进行堆土处理, 堆土高度 (50 ± 3) cm, 直径 (40 ± 3) cm; 对照组 (CK) 为自然条件下生长的竹笋。每处理布置 10 个重复。竹笋生长高度至约 (40 ± 3) cm 时, 于秆基处截断挖取

采样,每种处理选取3株无机械损伤、无病虫害的壮笋,按笋节横切分开(以竹笋基部第1个笋节为第1节),分别选取CK和EP处理第6节笋肉置于液氮中速冻,后转入 -80°C 冰箱保存待测。

1.2 试验方法

1.2.1 总RNA提取 按照RNeasy Plant Mini Kit (50)试剂盒(QIAGEN公司)说明书提取竹笋总RNA。用Nanodrop-2000c核酸蛋白测定仪(Thermo公司)检测RNA的纯度,同时使用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量以及完整性。

1.2.2 测序文库制备 使用结合有poly-T寡核苷酸的磁珠从总RNA中分离出含有poly-A的mRNA,加入片段化缓冲剂(Fragmentation)将其打断成片段,以mRNA为模板,采用随机引物法合成cDNA的第1条链,加入缓冲液、RNase H、dNTP混合物、DNA聚合酶I合成cDNA的第2条链,采用AMPure XP beads进行cDNA纯化。纯化后的cDNA经末端修复、poly(A)添加、测序接头连接及AMPure XP beads筛选得出大小合适的片段,后进行PCR扩增,建立测序文库。

1.2.3 测序 用IlluminaTM2500测序仪对构建合格的测序文库进行双末端(Paired-end)测序,测序在浙江谷禾信息技术有限公司进行。

1.2.4 测序数据处理及分析 将测序得到的原始图像进行碱基读取,转换为由短核苷酸序列组成的原始数据(Raw data)。对测序结果进行测序错误率分布及GC含量分布检验,去除含有接头及低质量的序列后,获得高质量的干净序列(Clean reads)。使用Trinity软件对Clean reads进行拼接组装,所得结果进一步使用Cap3进行组装和去冗余处理获得Unigene,统计Unigene的长度和分布。

采用BLASTX软件将麻竹笋Unigene序列与NCBI non-redundant protein sequences(Nr,参数为

1e-5)、Gene Ontology(GO,参数为1e-6)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG,参数为1e-10)、Protein family(Pfam,参数为1e-2)、Cluster of Orthologous Groups of proteins(COG,参数为1e-3)及Swiss-prot(参数为1e-5)数据库做比对注释。

1.2.5 差异表达基因分析 用FPKM法(Fragments per kb per million fragments),即每100万条fragments中,对基因的每1000个base而言,比对到该1000个base的fragments数来衡量Unigene的表达水平^[23]。用Cufflinks软件计算CK和EP处理基因表达水平的Fold-changes($P < 0.05$),并用Benjamini-Hochberg方法对原有假设检验得到的显著性P值进行校正,得出FDR(False discovery rate)值^[24],以 \log_2 Fold change ≥ 1 、FDR ≤ 0.05 为筛选条件找出差异表达基因,将其注释到GO和KEGG数据库中,获得差异表达基因的功能注释及相关代谢通路信息。

1.2.6 Real Time-PCR 根据前期实验结果及相关文献,在CK和EP处理转录组数据中筛选出磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase,PFK)、烯醇化酶(enolase,ENO)、苯丙酮酸/4-羟基苯丙酮酸转氨酶(Phenylpyruvate and 4-Hydroxyphenylpyruvate aminotransferases,PPY-AT/HPP-AT)、无色花色素还原酶(Leucoanthocyanidin reductase,LAR)基因,采用Primer-BLAST在线工具进行引物设计,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参基因^[25],具体引物序列见表1。采用1.2.1的方法提取CK和EP处理竹笋总RNA,按照PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒说明书合成cDNA的第1条链,在Mastercycler[®] ep realplex荧光定量PCR仪中进行扩增反应,反应体系为20 μL 。每个反应重复3次。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因编号 Gene number	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
Unigene000373	PFK	F-Primer:GTGGGAAGACAGGACTGATTAC	62
		R-Primer:CCTCCTCTCAACATCCATCAAC	62
Unigene000016	ENO	F-Primer:ACAACGATGGCTCACAGAAG	62
		R-Primer:CTGGTCAAAGGATCCTCAATC	62
Unigene000422	PPY-AT/HPP-AT	F-Primer:CTTGACAAAAGATGCCCAATCAG	62
		R-Primer:CCAACACGCTCTCCATACAA	62
Unigene023521	LAR	F-Primer:GGTGGAGTTCTACGATGACAAG	62
		R-Primer:GATGGAGTTGCAGCAGATGTA	62

1.3 统计分析

采用 SPSS 21.0 统计学分析软件分析表达差异性,通过 GraphPad Prism 6.01 绘图软件将所得结果绘制成柱状图。

2 结果与分析

2.1 测序数据组装结果统计

2.1.1 转录组测序数据统计 对 CK 和 EP 处理麻竹笋肉的 6 个样本进行转录组测序,共得到 36.45 Gb 原始数据,过滤掉不合格的 reads 后,各样本 Clean reads Q30 均大于 85.00%,平均 GC 含量为 53.00% (表 2)。

表 2 测序数据质量统计

Table 2 The quality statistics of sequencing data

样品 Sample	原始序列 Raw Reads /Mb	有效序列 Clean Reads /Mb	有效碱基数 Clean Base /Gb	Q30 值 Q30/%	GC 含量 GC/%
CS1	46.58	41.89	6.05	88.06	53.23
CS2	37.45	33.26	4.80	86.85	53.28
CS3	43.54	39.16	5.65	88.04	52.82
ES1	43.43	38.73	5.59	87.24	51.82
ES2	41.08	36.10	5.20	85.84	53.48
ES3	35.11	31.15	4.49	86.70	53.40

注:CS1、CS2、CS3 分别代表自然生长条件下竹笋的 3 个生物学重复(对照),ES1、ES2、ES3 分别代表覆土条件下竹笋的 3 个生物学重复(处理),下同。

Note: CS1, CS2 and CS3 are three biological replicates of bamboo shoots of natural growth conditions (CK); ES1, ES2 and ES3 are three biological replicates of bamboo shoots covered by soil (EP); The same below.

2.1.2 转录组样本重复性检验 根据 CK 和 EP 2 个处理 6 个样品的 FPKM 值计算各处理间的皮尔森相关系数,结果显示:CK 处理 3 个重复间相关系数均大于 0.90,EP 处理 3 个重复的相关系数均达 0.80 以上,表明各处理重复间的重复性良好(表 3)。

表 3 CK 和 EP 处理样本的重复性检验

Table 3 The repeatability test between CK and EP experiments

样本 Sample	CS1	CS2	CS3	ES1	ES2	ES3
CS1	-	0.98	0.98	0.89	0.79	0.77
CS2	0.98	-	0.99	0.89	0.81	0.79
CS3	0.98	0.99	-	0.90	0.84	0.58
ES1	0.89	0.89	0.90	-	0.85	0.80
ES2	0.79	0.81	0.84	0.85	-	0.81
ES3	0.77	0.79	0.78	0.80	0.81	-

2.1.3 Unigene 长度分布 对过滤后的数据进行拼接和去冗余处理,取每条基因中最长的转录本作 Unigene,共得到 53 388 个 Unigene 序列。Unigene 长

度是评估转录组组装质量的重要标准之一,本实验中,长度在 1 000 bp 以上的 Unigene 有 15 176 个,占总数的 28.43%。序列平均长度为 874.16 bp,N50 长度为 1 484 bp(表 4),表明组装效果较为理想。

表 4 Unigene 长度分布统计

Table 4 The length statistics of Unigene distribution

Unigene 长度 Unigene length/bp	数量 Number	占总数比例 Percentage/%
200 ~ 300	14 823	27.77
300 ~ 500	11 822	22.14
500 ~ 1 000	11 567	21.66
1 000 ~ 2 000	9 640	18.06
> 2 000	5 536	10.37
总数 Total number	53 388	100.00
总长度 Total length/bp	46 669 712	
平均长度 Average length/bp	874.16	
N50 长度 N50 length/bp	1 484	

2.1.4 Unigene 的功能注释 将 Unigene 序列比对到 Nr、GO、KEGG、Swissprot、Pfam、COG 数据库中,获得 Unigene 的功能注释信息。最终获得注释信息的 Unigene 有 31 462 条,所占比例为 58.93% (表 5),其中,比对到 Nr 数据库中的 Unigene 最多,所占比例为 58.03%,比对到同源序列比例最高的物种分别为粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* Kato)、短柄草(*Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv.)、短花稻(*O. brachyantha* A. Chev. et Roehr.)、梁(*Setaria italica* (L.) Beauv.)、节节麦(*Aegilops tauschii* Coss)、玉米(*Zea mays* L.)、籼稻(*O. sativa* L. subsp. *indica* Kato)、高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、扫帚黍(*Dichanthelium oligosanthes* (J. A. Schultes) Gould)、大麦(*Hordeum vulgare* Linn.) (图 1)。比对结果表明:麻竹与稻属(*Oryza* L.) 植物有最近的亲缘关系,占总体比例的 37.08%。

表 5 Unigene 功能注释结果统计

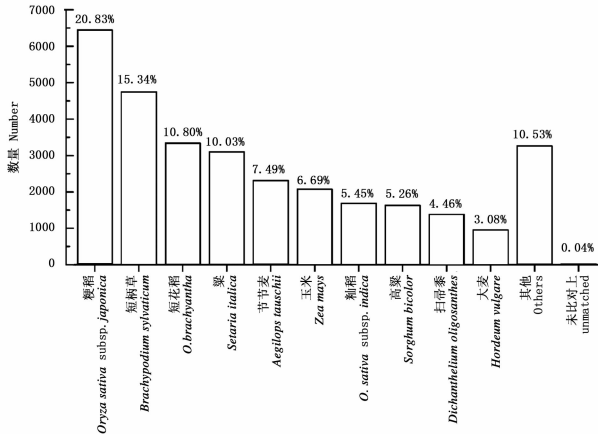
Table 5 Unigene functional annotation statistical results

数据库 Databases	Nr	GO	KEGG	Swissprot	Pfam	COG	总体 Total
数目 Number	30 979	24 925	6 294	21 245	16 346	9 875	31 462
所占比例 Percentage/%	58.03	46.69	11.79	39.79	30.62	18.50	58.93

2.2 差异表达基因分析

2.2.1 差异表达基因的筛选 对 CK 和 EP 2 个处理的转录组测序结果进行比较分析,按照表达量差异倍数不小于 2 倍、FDR ≤ 0.05 的标准,筛选出差异表达基因 1 846 个,其中,在 EP 处理中上调表达基

因有 998 个, 占所有差异基因的 54.1%; 在 EP 处理中下调表达基因有 848 个, 所占比例为 46.9%。



注: 测序数据比对物种中梗稻和籼稻为栽培种, 文中注以其亚种拉丁文。

Note: The sequencing data were compared with japonica rice and indica rice, which were named after the corresponding subspecies.

图1 Nr库中Unigene比对物种数目和比例

Fig. 1 Number and proportion of Unigene that annotated to different species in Nr database

表6 麻竹笋差异表达基因GO注释

Table 6 GO annotation of differentially expressed genes in ma bamboo shoot

本体 Ontology	GO 登录号 GO_accession	类目 Term	基因数目 Number of Unigene
生物学过程 Biological processes	GO:0006091	代谢物前体和能量的产生 Generation of precursor metabolites and energy	35
	GO:0005975	碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process	48
	GO:0009056	降解过程 Cprocess	55
	GO:0015979	光合作用 Photosynthesis	13
	GO:0065008	生物学质量调控 Regulation of biological quality	20
分子功能 Molecular function	GO:0030528	转录调节因子活性 Transcription regulator activity	37
	GO:0003700	转录因子活性 Transcription factor activity	37
	GO:0005215	载体活性 Transporter activity	63
	GO:0003824	酶催化活性 Catalytic activity	393

表7 麻竹笋差异基因的显著富集的代谢途径

Table 7 Significant enrichment pathway of differentially expressed genes in ma bamboo shoot

通路编号 Pathway ID	类目 Term	基因数目 Number of Unigene (所占比例) (Percentage/%)	FDR 值 FDR
ko01130	抗生素生物合成 Biosynthesis of antibiotics	83 (29.12)	0.00
ko00010	糖酵解/糖异生作用 Glycolysis / Gluconeogenesis	31 (10.88)	0.00
ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan	17 (5.96)	0.00
ko00710	光合作用碳固定 Carbon fixation in photosynthetic	14 (4.91)	0.00
ko00940	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	11 (3.86)	0.04
ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	11 (3.86)	0.00
ko00620	丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	10 (3.51)	0.00
ko00680	甲烷代谢 Methane metabolism	9 (3.16)	0.00
ko00051	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	9 (3.16)	0.00
ko00564	甘油磷酸酯代谢 Glycerophospholipid metabolism	8 (2.81)	0.02

2.2.4 竹笋中单宁和芳香族氨基酸合成相关基因表达分析 根据 Unigene 在各数据库的功能释义, 并结合差异基因在 KEGG 数据库中富集的通路, 对

2.2.2 差异表达基因的 GO 功能分析 将差异表达基因与 GO 数据库比较, 共有 701 个基因得到了注释。GO 分类统计显示, 差异表达基因富集在生物学过程中的 Unigene 有 171 个, 富集最多的是降解过程亚类, 占比对到该功能类别总数的 32.2%; 富集在分子功能中的 Unigene 有 530 个, 富集最多的亚类是酶催化活性, 占比对到该功能类别总数的 74.2% (表 6)。

2.2.3 差异表达基因的 KEGG 功能分析 为了系统分析 CK 和 EP 处理所产生的差异表达基因涉及的代谢途径及行使功能, 将差异基因注释到 KEGG 数据库中, 共得到 235 个功能定义, 显著富集的 pathway 有 32 条 ($FDR \leq 0.05$), 其中, 注释序列最多的 10 条代谢通路为: 抗生素生物合成, 糖酵解/糖异生作用, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 光合作用碳固定, 苯丙烷生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 甲烷代谢, 果糖和甘露糖代谢, 甘油磷酸酯代谢 (表 7)。

麻竹笋苦涩味物质合成相关基因进行查找分析。结果 (表 8) 显示: 在 CK 和 EP 处理转录组测序数据注释的结果中查找到了与苯丙氨酸、酪氨酸、单宁生物

合成相关的大部分酶的基因序列,涉及到的生物代谢途径有糖酵解途径、磷酸戊糖途径、莽草酸途径和花青素途径等,其中,在糖酵解途径中,葡萄糖磷酸变位酶(Phosphoglucumutase, *PGC*)和果糖激酶(Fructokinase, *FK*)基因在CK和EP处理中的表达量无明显变化,磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase, *PFK*)和烯醇化酶(Enolase, *ENO*)基因的表达量在EP处理中降低;糖酵解和磷酸戊糖途径所共有的磷酸己糖异构酶(Phosphohexoisomerase, *PHI*)、醛缩酶(Aldolase, *ALDO*)及磷酸丙糖异构酶(Triosephosphate isomerase, *TPI*)的表达量在EP处理中表现出下降趋势,而已糖激酶(Hexokinase, *HK*)的表达量无明显变化。在后分支酸途径中,苯丙酮酸/4-羟基苯丙酮酸转氨酶(Phenylpyruvate and 4-Hydroxyphenylpyruvate aminotransferases, *HPP-AT/PPY-AT*)在EP处理中表达量显著降低,分支酸变位酶(Chorismate mutase, *CM*)、预苯酸转氨酶(Prephenate aminotransferase, *PPA-AT*)、阿罗酸/预苯酸脱水酶(Arogenate/

prephenate dehydratase, *ADT/PDT*)及阿罗酸/预苯酸脱氢酶(Arogenate/Prephenate dehydrogenase, *ADH-PDH*)的表达量在CK和EP处理中无明显差异。在花青素途径中,无色花色素还原酶(Leucoanthocyanidin reductase, *LAR*)在EP处理中表达量降低,无色花色素双加氧酶(Leucoanthocyanidin dioxygenase / anthocyanidin synthase, *LDOX/ANS*)和花色素还原酶(Anthocyanidin reductase, *ANR*)在CK和EP处理中未表现出差异表达。

2.2.5 Real Time-PCR 验证 为验证转录组测序结果,本研究挑选 *PFK* (Unigene000373)、*ENO* (Unigene000016)、*PPY-AT/HPP-AT* (Unigene000422)、*LAR* (Unigene023521) 4个基因进行 Real-time PCR 实验。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因在CK和EP处理2个样本中的相对表达量,统计分析结果(图2)显示:所选的4个基因在CK和EP处理中表达变化情况与测序分析结果一致,均在EP处理中呈现下调趋势,且在 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

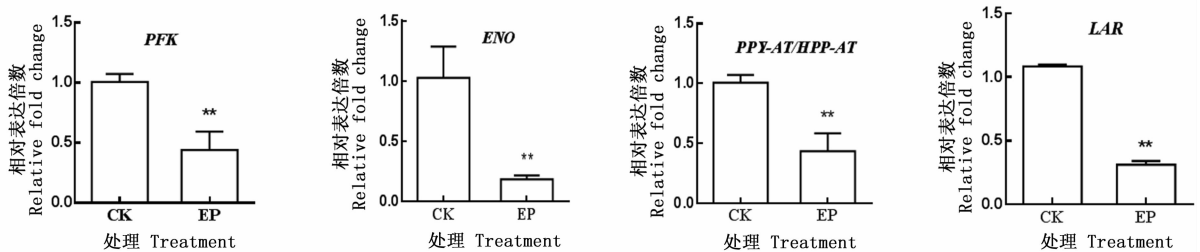


图2 4个基因在CK和EP处理中的表达量分析

Fig. 2 The expression analysis of four genes in CK and EP experiments

表8 CK和EP处理中单宁、苯丙氨酸、酪氨酸合成相关基因表达情况

Table 8 Gene expression of tannin, phenylalanine and tyrosine in CK and EP experiment

代谢途径 Metabolic pathways	酶基因名称 Enzyme gene name	酶编号 Enzyme number	FPKM		\log_2 Fold change (EP/CK)
			CK	EP	
糖酵解途径 Glycolytic pathway	<i>PGC</i>	EC:5.4.2.2	109.43	95.52	-0.20
	<i>FK</i>	EC:2.7.1.4	437.72	424.31	-0.04
	<i>PFK</i>	EC:2.7.1.11	1 061.13	434.68	-1.29 *
	<i>ENO</i>	EC:4.2.1.11	824.33	339.61	-1.28 *
	<i>HK</i>	EC:2.7.1.1	143.52	140.34	-0.03
糖酵解和磷酸戊糖共有途径 The common pathway of glycolysis and pentose phosphate	<i>PHI</i>	EC:5.3.1.9	177.97	112.64	-0.66
	<i>ALDO</i>	EC:4.1.2.13	1 077.43	389.82	-1.47 *
	<i>TPI</i>	EC:5.3.3.1	228.93	125.91	-0.86
	<i>CM</i>	EC:5.4.99.5	83.63	89.41	0.09
后分支酸途径 The posterior branch acid pathway	<i>PPA-AT</i>	EC:2.6.1.79	42.24	40.31	-0.07
	<i>ADT/PDT</i>	EC:4.2.1.91/4.2.1.51	76.02	75.52	-0.01
	<i>ADH-PDH</i>	EC:1.3.1.78/1.3.1.12	13.24	14.22	0.11
	<i>PPY-AT/HPP-AT</i>	EC:2.6.1.5	414.91	173.23	-1.26 *
花青素途径 Anthocyanin pathway	<i>LAR</i>	EC:1.17.1.3	3.08	0.36	-3.10 *
	<i>LDOX/ANS</i>	EC:1.14.11.19	3.52	3.69	0.08
	<i>ANR</i>	EC:1.3.1.77	9.04	8.71	-0.05

注:表中“*”表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

Note: The “*” in the table indicates that the difference is significant at the $P < 0.05$ level.

3 讨论

3.1 麻竹笋转录组测序分析

近年来,高通量测序技术得到了迅速发展,其通量高、成本低、灵活性高、灵敏度高的特点大大提高了测序的效率^[26],为深入研究缺乏基因组数据的非模式植物的基因表达与表型之间的关系奠定了基础。高通量测序的样本可选用组织,也可选用细胞或细胞系,需根据实验目的选择样品。有研究发现,麻竹笋不同笋节的苦味物质含量差异较大,且光照对麻竹笋苦涩味物质的合成产生一定的影响^[4]。前期试验结果显示,CK和EP处理第6节笋肉的单宁含量分别为1.12、0.74 mg·g⁻¹,芳香族氨基酸的含量分别为1.31、0.94 mg·g⁻¹,在 $P < 0.01$ 水平上差异显著(数据暂未发表),且口感差异较大,因此,本试验选用了CK和EP处理的第6节笋肉作为实验材料。

本研究通过转录组测序,得到了自然生长和覆土条件下6个麻竹笋样本的36.45 Gb的原始数据,并获得了N50长度为1 484 bp的非冗余Unigene 53 388个,Unigene平均长度874.16 bp。Liu等^[22]通过对麻竹不同组织材料(根、茎、叶、花、种子、笋)进行转录组测序,得到N50长度和平均长度分别为1 132.736 bp的Unigene 68 229个,本次研究测序结果与之相近。Zhang等^[27]利用Illumina平台对麻竹不同发育时期花的转录组进行从头测序,获得高质量的Unigene 146 395个,平均长度为461 bp;王身昌等^[20]分析了梁山慈竹及其体细胞突变体的转录组测序结果,得到84 741个Unigene,其平均长度约为858 bp,N50长度为1 595 bp。总体来讲,本研究与已报道的基于高通量测序平台所得的常见竹种的转录本及Unigene的平均长度基本相似,表明此研究测序数据的拼接基本符合后续生物信息学分析。在Nr数据库中,Unigene比对到同源序列比例最高的物种为稻属植物,这与前人在与水稻、玉米和麦类作物的比较中,竹类植物与水稻有最近的亲缘关系和更相似的基因序列特征相一致^[28]。

GO富集结果表明,差异表达基因涉及到多个生物功能,其中,富集较多的有代谢物前体和能量的产生、碳水化合物代谢过程和酶催化活性,表明CK和EP处理在物质能量代谢活动上有差异。KEGG聚类分析显示,与麻竹笋苦涩味物质合成相关的多个次生代谢通路如苯丙烷生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸

和色氨酸生物合成途径在CK和EP处理中表现出显著差异,表明避光处理在转录水平上对麻竹笋苦涩味物质的合成产生了较大影响。

3.2 麻竹笋单宁、苯丙氨酸、酪氨酸合成通路中关键基因分析

葡萄糖经糖酵解和磷酸戊糖途径分别生成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P),后经莽草酸途径、后分支酸途径生成酪氨酸、苯丙氨酸。苯丙氨酸经苯丙烷途径、类黄酮途径及花青素途径生成原花青素,即缩合单宁^[29-31],其中,涉及到大量的酶,由一系列复杂的基因在时间和空间上共同作用调控,环境因素可能通过影响某些基因的表达而对苦涩味物质合成产生一定的影响。

PFK是糖酵解途径中的一个重要的限速酶,其作用是不可逆地催化果糖-6-磷酸生成果糖-1,6-二磷酸。有研究发现,菠萝(*Ananas comosus* (L.) Merr.)叶片或离体的菠萝叶圆片经光照处理后,依赖于焦磷酸的焦磷酸果糖激酶(*PPi-PFK*)活性增高,而暗处理使酶对糖酵解方向催化活性降低^[32]。本研究发现,覆土处理的麻竹笋PFK酶基因表达量降低,这可能会导致PFK酶活性降低,糖酵解代谢过程受到阻碍。*ALDO*催化果糖-1,6-二磷酸可逆地裂解为甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸,是糖酵解和磷酸戊糖途径共有代谢过程中重要的调控酶之一。目前,对于*ALDO*的研究多集中于激素调控和抗逆性方面。Konishi等^[33]研究发现,向水稻根部外施赤霉素后,水稻根尖部位*ALDO*基因表达量升高。另外,有研究表明,在低温^[34]、高盐^[35]或干旱^[36]胁迫条件下,拟南芥*ALDO*家族基因发生显著响应,说明*ALDO*基因对植物的逆境胁迫有一定的抵御作用。*ENO*在Mg²⁺的参与下,催化2-磷酸甘油酸合成PEP,是控制PEP合成的关键酶。Forsthoefel等^[37]发现在高温或盐胁迫条件下,冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum* Linn.)的叶片和根的*ENO*基因有较高的转录表达水平,且叶片的*ENO*酶活性提高了4倍以上,表明*ENO*基因可能与植物的抗逆性相关。从本研究可以看出,光照下麻竹笋*ENO*基因的表达量是覆土条件下的2倍,说明*ENO*基因表达可能受光照诱导影响。

苯丙氨酸和酪氨酸的共同前体物质是由分支酸变位酶催化分支酸生成的预苯酸。从预苯酸到苯丙氨酸有两条生物合成途径,一是经*PPA-AT*生成阿罗酸,由*ADT*进一步催化阿罗酸合成(阿罗酸途

径);二是经 *PDT* 生成苯丙酮酸,后经 *PPY-AT* 催化合成(苯丙酮酸途径)^[29]。酪氨酸的合成与苯丙氨酸路径类似,参与的酶有 *PDH*、*HPP-AT*、*PPA-AT* 和 *ADH*。实验结果显示,麻竹笋 *HPP-AT*/*PPY-AT* 基因在黑暗条件下表达量下降,而涉及到的其它酶表达量无明显变化,表明避光处理未对阿罗酸途径产生影响,可能是通过降低苯丙酮酸转氨酶和对羟基苯丙酮酸转氨酶的活性影响苯丙氨酸和酪氨酸的合成。

LAR、*ANS* 和 *ANR* 作为原花青素合成下游途径的3个关键酶,可以把无色花色苷催化合成单宁前体物质儿茶素和表儿茶素^[38]。有研究证实,*LAR* 基因的表达和缩合单宁的合成呈正相关^[39-41]。Hong等^[42]发现,茶叶(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)经黑暗处理72 h后,*ANS* 基因表达量降低,而 *LAR* 基因的表达量升高,茶叶内表儿茶素和儿茶素的含量变化趋势与 *ANS* 和 *LAR* 基因的表达量变化相一致。麻竹笋经过避光处理后,其单宁含量较自然生长竹笋有所下降,*LAR* 基因表达量降低,而 *ANS* 和 *ANR* 基因的表达量保持不变,说明光照可能是通过影响 *LAR* 基因的表达而对麻竹笋单宁的合成造成影响。此外,CK 和 EP 处理转录组测序数据也注释到了单宁、苯丙氨酸、酪氨酸合成相关酶 *PGC*、*FK*、*HK*、*PHI*、*TPI*、*CM* 等基因,但其表达量在 CK 和 EP 处理间未表现出差异或差异不显著,表明这些酶可能未对避光处理作出应答反应,其作用机制有待进一步研究。

4 结论

本研究通过转录组测序方法对覆土处理和自然生长的麻竹笋进行了差异表达基因的分析。结果显示,在避光条件下,苯丙氨酸、酪氨酸、单宁生物合成关键酶 *PFK*、*ENO*、*PPY-AT*/*HPP-AT*、*LAR* 基因表达量显著降低,可能最终影响麻竹笋苦涩味物质的合成。本研究从转录水平上初步分析了避光麻竹笋苦涩味物质合成的影响,为今后相关性状基因的克隆以及功能分析等研究提供了理论参考。

参考文献:

[1] 周本智. 麻竹出笋和高生长规律的研究[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5):461-466.
 [2] 罗晓丽. 不同处理对竹笋采后木质化及品质的影响[D]. 重庆:西南大学,2007.
 [3] 章志远,丁兴萃,崔逢欣,等. 利用感官评定方法确定竹笋苦涩

味物质及与口感的关系[J]. 食品科学,2017,38(5):167-173.
 [4] 李雪蕾,丁兴萃,张闪闪,等. 不同光强下麻竹笋不同部位苦涩味物质含量的变化[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2015, 39(3):161-166.
 [5] Dixon R A, Xie D Y, Sharma S B. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research [J]. New Phytologist, 2005, 165(1):9-28.
 [6] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1):405-430.
 [7] 赵文军,张迪,马丽娟,等. 原花青素的生物合成途径、功能基因和代谢工程[J]. 植物生理学报,2009,45(5):509-519.
 [8] Yuan L, Wang L, Han Z, et al. Molecular cloning and characterization of PtrLAR3, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa* and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2513.
 [9] 李军,梁燕梅,赵爱春,等. 桑树花青素还原酶基因 MaANR 的克隆和表达分析[J]. 蚕业科学, 2016(4):570-575.
 [10] Tanner G J, Francki K T, Abrahams S, et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(34):31647-31656.
 [11] 夏勃. 斑苦竹笋(*Arundinaria oleosa*)营养成分和化学成分分析[D]. 南京:南京林业大学,2006.
 [12] 朱玉燕,邬波龙,赵宇瑛,等. 绿竹笋苦涩味物质成分分析[J]. 食品科技, 2015, 40(8):77-80.
 [13] Schmid J, Amrhein N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants [J]. Phytochemistry, 1995, 39(4):737-749.
 [14] 汪华,崔志峰. 莽草酸生物合成途径的调控[J]. 生物技术通报, 2009(3):50-53.
 [15] 杨捷,钱晋,叶江,等. 大肠杆菌莽草酸生物合成途径的基因操作[J]. 华东理工大学学报:自然科学版, 2009, 35(2):207-212.
 [16] 初英娜,张珍珍,潘秋红. 紫外照射对葡萄果实莽草酸途径相关基因表达的影响[J]. 植物生理学报, 2010, 46(9):902-908.
 [17] 李春兰. 葡萄果实中莽草酸途径与多酚积累的关系[J]. 现代农业科技, 2010(12):33-36.
 [18] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1):57-63.
 [19] 周华,张新,刘腾云,等. 高通量转录组测序的数据分析与基因发掘[J]. 江西科学,2012,30(5):607-611.
 [20] 王身昌,胡尚连,曹颖,等. 梁山慈竹高通量转录组测序及差异表达基因分析[J]. 华北农学报,2016,31(3):65-71.
 [21] Peng Z, Lu Y, Li L, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. Nature Genetics, 2013, 45(4):456-461.
 [22] Liu M, Qiao G, Jiang J, et al. Transcriptome sequencing and de novo analysis for ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) using the illumina platform [J]. Plos One, 2012, 7(10):e46766.

- [23] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5):511–515.
- [24] Finn R D, Bateman A, Clements J, *et al.* Pfam: the protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): 222–230.
- [25] Liu M, Jiang J, Han X, *et al.* Validation of reference genes aiming accurate normalization of qRT-PCR data in *Dendrocalamus latiflorus* Munro[J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e87417.
- [26] 高志民, 杨 丽, 赵韩生, 等. 竹类植物基因组学发展的机遇与挑战[J]. *世界竹藤通讯*, 2013, 11(6):1–6.
- [27] Zhang X M, Zhao L, Larsonrabin Z, *et al.* De novo sequencing and characterization of the floral transcriptome of *Dendrocalamus latiflorus* (Poaceae: Bambusoideae). [J]. *Plos One*, 2012, 7(8):e42082.
- [28] 樊龙江, 郭兴益, 马乃训. 竹类植物与水稻等其它禾本科作物的系统进化关系及基因序列组成的比较[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(2):165–169.
- [29] Maeda H, Dudareva N. The Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63(1):73–105.
- [30] Pang Y, Peel G J, Wright E, *et al.* Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(3):601–615.
- [31] Herrmann K M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(1):7–12.
- [32] Wu M X, Zha J J, Shi J N, *et al.* Dark/ Light Modulation of Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase from Pineapple Leaves [J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1989, 15(1):90–94.
- [33] Konishi H, Yamane H, Maeshima M, *et al.* Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(6):839–848.
- [34] Provart N J, Gil P, Chen W, *et al.* Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2):893–906.
- [35] Jiang Y, Yang B, Harris N S, *et al.* Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(13):3591–3607.
- [36] 路 玮. 拟南芥果糖 1,6-二磷酸醛缩酶家族分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [37] Forsthoefel N R, Cushman J C. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(3):1185–1195.
- [38] Xie D Y, Sharma S B, Paiva N L, *et al.* Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis [J]. *Science*, 2003, 299(5605):396–399.
- [39] 马春雷, 乔小燕, 陈 亮. 茶树无色花色素还原酶基因克隆及表达分析[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(1):27–36.
- [40] Paolucci F, Robbins M P, Madeo L, *et al.* Ectopic expression of a basic helix-loop-helix gene transactivates parallel pathways of proanthocyanidin biosynthesis. structure, expression analysis, and genetic control of leucoanthocyanidin 4-reductase and anthocyanidin reductase genes in *Lotus corniculatus* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1):504–516.
- [41] Punyasiri P A, Abeysinghe I S, Kumar V, *et al.* Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathway[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004(431):22–30.
- [42] Hong G, Wang J, Zhang Y, *et al.* Biosynthesis of catechin components is differentially regulated in dark-treated tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. *Plant Physiology & Biochemistry Ppb*, 2014, 78(3):49–52.

(责任编辑:金立新)