

• 药材与资源 •

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

李雅静¹, 王丰青^{2*}, 谢彩侠^{1*}, 智惊宇², 孟庆博¹, 耿晓桐¹, 陶晓赛¹, 张 苗¹

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002

摘 要: **目的** 分析比较盾叶薯蓣根茎与叶片的转录组, 挖掘与盾叶薯蓣中皂苷元生物合成途径相关的关键酶基因。**方法** 利用 Illumina HiSeq2000 高通量测序技术对盾叶薯蓣根茎与叶片进行转录组测序, 对测序结果进行注释分析; 并结合根茎与叶片中皂苷元的含量测定结果, 挖掘与盾叶薯蓣中皂苷元生物合成途径相关的关键酶基因; 最后利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对部分候选基因的表达模式进行分析。**结果** 共获得了 81 660 个 Unigene, 有 64.33% 在 NT、NR、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG 数据库中得到注释; 根据其表达量与代谢通路分析筛选出 29 种共 227 个可能参与盾叶薯蓣中皂苷元生物合成途径的催化酶基因, 部分催化酶基因的表达模式与皂苷元含量具有一定相关性; 并发现 5 个盾叶薯蓣内生菌基因。**结论** 研究初步获得了盾叶薯蓣中参与皂苷元生物合成的候选关键酶基因, 部分候选酶基因可能参与盾叶薯蓣中皂苷类成分的后修饰过程, 并发现盾叶薯蓣根茎中内生菌可能参与其皂苷元的生物合成, 为进一步阐明盾叶薯蓣中皂苷元生物合成的分子机制奠定基础。

关键词: 盾叶薯蓣; 转录组; 皂苷元; 关键酶基因; 高通量测序

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3885-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.024

Analysis of transcriptome of *Dioscorea zingiberensis* and excavation of key enzyme genes of saponin biosynthesis

LI Ya-jing¹, WANG Feng-qing², XIE Cai-xia¹, ZHI Jing-yu², MENG Qing-bo¹, GENG Xiao-tong¹, TAO Xiao-sai¹, ZHANG Miao¹

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: **Objective** To compare and analyze the transcriptome of rhizome and leaves of *Dioscorea zingiberensis*, and excavate the key enzyme genes related to the saponin biosynthetic pathway in *D. zingiberensis*. **Methods** The transcriptome of rhizome and leaves of *D. zingiberensis* were sequenced by Illumina HiSeq2000 high-throughput sequencing technique. According to sequence annotate results to find the differentially expressed genes. Then the key enzyme genes related to the biosynthesis of diosgenin were identified according to the content of saponins in rhizomes and leaves of *D. zingiberensis*. The expression levels of some candidate genes were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** A total of 81 660 Unigenes were gained and 64.33% of them were annotated in NT, NR, Swiss-Prot, KOG, GO, and KEGG databases. Based on their expression and KEGG annotation, totally 227 catalytic enzyme genes of 29 kinds that may participate in *D. zingiberensis* saponin biosynthetic pathway were screened. The expression pattern of some catalytic enzymes was correlated with the content of saponin. Also were found five *D. zingiberensis* endophyte genes. **Conclusion** This experiment obtained candidate key enzyme genes tentatively that involved in the biosynthesis of saponin. Some candidate enzyme genes may participate in the post-modification process of steroidal saponins in *D. zingiberensis*. In addition, it was found that *D. zingiberensis* endotrophic bacteria may be involved in the saponin biosynthesis. The results laid a foundation to further elucidate the molecular mechanism of saponin synthesis pathway.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; transcriptome; saponin; key enzyme gene; high-throughput sequencing

收稿日期: 2018-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473299); 河南省科技攻关项目 (182102311156)

作者简介: 李雅静, 硕士, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18703635579 E-mail: 420950121@qq.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。Tel: 18838226892 E-mail: heauzyxw@126.com
谢彩侠, 博士, 教授, 从事中药质量控制研究。Tel: 13673651577 E-mail: 1210571736@qq.com

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 为薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属植物, 俗称黄姜、火头根, 以根茎入药, 具有清肺止咳、利尿通淋、通络止痛、解毒消肿等功效。盾叶薯蓣为我国特有品种^[1], 其薯蓣皂苷元 (俗称薯蓣皂素) 质量分数为 1.1%~16.15%, 高于墨西哥菊叶薯蓣 *Dioscorea composita* Hemsl. 中的薯蓣皂素含量, 是世界上最好的甾体激素类药源植物之一^[2-4], 目前已被应用于 300 多种避孕药及甾体激素类药物的合成^[5]。盾叶薯蓣皂苷元生物合成途径的解析对盾叶薯蓣药材的质量控制及利用生物细胞器或其他宿主生产皂苷元具有重要意义, 但目前关于盾叶薯蓣的研究主要集中在皂苷含量测定、结构解析和药理活性等方面, 其皂苷元的生物合成途径尤其是下游途径及其调控机制研究报道较少^[6-10], 故迫切需要基于分子生物学方法挖掘与皂苷元生物合成相关的酶基因, 为明确其生物合成分子机制奠定基础。

甾体皂苷类物质属于药用植物体内一类重要的次生代谢产物, 而药用植物中次生代谢产物的合成积累往往具有组织特异性, 调控这些产物合成的相关酶基因的表达模式也同样具有组织特异性。基于此, 本实验利用 Illumina HiSeq2000 测序技术获得盾叶薯蓣根茎及叶片的转录本信息, 构建盾叶薯蓣根茎及叶片的转录组数据库, 通过对根茎及叶片转录本及差异表达基因的分析, 结合根茎和叶片中皂苷元的含量, 筛选与皂苷元生物合成相关的候选基因, 为进一步揭示盾叶薯蓣中甾体皂苷生物合成的分子机制提供丰富的数据资源。

1 材料

药用植物盾叶薯蓣根茎与叶片采自河南淅川县盾叶薯蓣种植基地, S1~S9 为根茎, S10~S18 为叶片, 经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright。

2 方法

2.1 根茎和叶片中皂苷元含量测定

采用左春芳等^[11]测定皂苷元的方法分别测定盾叶薯蓣根茎与叶片中的皂苷元含量。

2.2 根茎和叶片 RNA 提取与质检

选择生长健壮无病害的盾叶薯蓣植株, 无菌水洗净整个块根和叶片, 用灭菌后的吸水纸吸干表面水分, 快速将根茎和叶片切成约 5 mm 厚的薄片, 立即用液氮速冻, 后放入 -80 °C 冰箱保存备用。以 MiniBEST 试剂盒 (TaKaRa 公司, 大连) 进行柱式

法提取盾叶薯蓣总 RNA。以 NanoDrop 和 Agilent2100 检测总 RNA 的完整性和浓度。

2.3 转录组测序及组装

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 Real-Time PCR System 进行质量和产量检测, 文库质检合格后进行测序。由测序所得的数据称为 raw reads 或 raw data, 随后对 raw reads 进行质检 (QC), 以确定测序数据是否适用于后续分析。QC 合格后使用 Trinity 软件对片段进行组装。

2.4 基因的功能注释

使用 BLAST 程序将组装得到的 Unigene 与 NT、NR、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG 数据库比对, 进行 Unigene 的序列相似性分析与功能注释, 并根据基因的表达量筛选出的样品间差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 进行代谢通路定位分析。

2.5 基因表达量分析

利用 SOAP 和 LASTZ 软件计算各基因的表达量, 用 FPKM 表示, 具体计算公式如下。

$$FPKM = \frac{10^6 C}{NL/10^3}$$

FPKM 为基因的表达量, C 为唯一比对到基因的 fragments 数, N 为唯一比对到参考基因的总 fragments 数, L 为基因编码区的碱基数

2.6 差异表达基因筛选

参照 Audic 等^[12]发表在 Genome Research 上的基于测序的差异基因检测方法, 根据 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 ≤ 0.05 且倍数差异在 2 倍以上的基因。

2.7 实时荧光定量 (qRT-PCR) 分析

采用 qRT-PCR 对基因表达水平进行验证。提取盾叶薯蓣组织的总 RNA, 反转录采用反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连)。所用仪器为 BIO-RAD IQ5 (伯乐, 上海)。qRT-PCR 试剂盒为 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa 公司, 大连)。以 DzAct4-like 蛋白编码基因为内参基因, 引物由上海生工合成。PCR 扩增体系: SYBR[®] Premix Ex Taq 12.5 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, 共计 25 μ L。反应条件: 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。根据 BIO-RAD

iQ5 软件生成的 C_t (cycle threshold) 值, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 根茎和叶片中皂苷元含量测定结果

为了分析盾叶薯蓣根茎与叶片中皂苷元的含量, 分别以 HPLC 方法测定了 18 份根茎和叶片样品, S1~S9 中皂苷元量分别为 0.658%、0.752%、0.639%、0.464%、0.625%、0.822%、0.541%、0.464%、0.663%, S10~S18 中皂苷元量分别为 0.298%、0.175%、0.138%、0.257%、0.271%、0.197%、0.344%、0.176%、0.273%, 根茎中皂苷元的量普遍高于叶片。根茎中最低量为 0.464%, 最高量为 0.822%; 叶片中最低量为 0.138%, 最高量为 0.344%。

应用 SPSS 19.0 对数据进行配对样本 t 检验, 结果显示两组数据的 t 为 7.652, $P < 0.001$, 表明 2 组数据的差异具有极显著差异。

3.2 转录组测序与数据组装

采用 Illumina HiSeq2000 高通量测序技术对盾叶薯蓣根茎及叶片转录组分别测序, 分别得 5.4×10^7 、 5.9×10^7 个 raw reads, 去污染、去接头后得到

5.2×10^7 、 5.5×10^7 个 clean reads, 数据有效率分别为 94.41%、93.00%, 碱基数目分别为 4.6×10^9 、 4.9×10^9 , clean reads 的碱基错误率 (Q20) 分别为 98.08%、97.96% (一般大于 90%), GC 含量分别为 45.29%、47.32%, 基本呈正态分布。利用 Trinity 对质量合格的 clean reads 进行组装, 盾叶薯蓣根茎与叶片测序结果进行 de novo 组装共得到 81 660 个 Unigene (表 1), 总长度为 74 276 257 nt, 平均长度 910 nt, N50 为 1 527 nt, 其中叶片中组装得到 58 893 个 Unigene, 总长度为 52 795 706 nt, 平均长度 896 nt, N50 为 1 631 nt, 根茎中组装得到 98 140 个 Unigene, 总长度为 66 146 966 nt, 平均长度 674 nt, N50 为 1 325 nt。由结果可知测序片段质量合格, 可以进行下一步的数据整理与分析。

3.3 序列功能注释

使用 BLAST 程序将组装得到的所有 Unigene 与 NT、NR、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG 数据库比对, 进行 Unigene 的序列相似性分析, 从而得到该 Unigene 的蛋白质功能注释信息, 并分别对注释到每个库以及所有注释上的 Unigene 数目进行统计 (表 2)。

表 1 盾叶薯蓣转录组测序统计结果

Table 1 Statistics of *D. zingiberensis* transcriptome sequencing data

序列种类	样品	序列数	总长度/nt	平均长度/nt	N50/nt
Contig	叶片	82 560	37 532 732	455	1 035
	根茎	164 658	56 301 126	342	621
Unigene	叶片	58 893	52 795 706	896	1 631
	根茎	98 140	66 146 966	674	1 325
	合计	81 660	74 276 257	910	1 527

表 2 注释结果统计

Table 2 Statistics of annotation results

数据库	数量	占比/%	数据库	数量	占比/%
NR	50 283	61.58	COG	25 388	31.09
NT	33 235	40.70	GO	35 648	43.65
Swiss-Prot	34 789	42.60	ALL	52 530	64.33
KEGG	33 512	41.04			

3.4 NR 数据库注释与分类

通过 BLAST 与 NR 数据库进行对比, 有 50 283 条 Unigene 获得注释。注释结果显示, 在葡萄 *Vitis vinifera* L. 中获得同源注释的 Unigene 数量最多 (图 1), 占获得注释 Unigene 的 23.7%, 其次在日本水稻 *Oryza latifolia* Desv.、桃树 *Amygdalus persica* L. 中得到同源注释的 Unigene 也较多分别为 6.9%、5.6%, 在

黑胡杨 *Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* (Torr. & Gray) Brayshaw、蓖麻 *Ricinus communis* L.、玉米 *Zea mays* L.、二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. 中得到同源注释得 Unigene 较少, 分别为 4.7%、4.7%、4.6%、4.2%, 其余 45.5% 注释到其他物种中。

3.5 COG 注释与分类

将盾叶薯蓣所有 Unigene 与 COG 数据库进行比对, 预测基因功能并分类统计。结果表明有 25 388 条 Unigene (31.09%) 被注释到 26 种 COG 分类中 (图 2)。从基因功能分布特征中可看出一般功能预测基因分布最多, 多达 7 987 个, 涉及转录的基因次之, 有 4 952 个, 而涉及核结构、胞外结构的基因很少, 分别有 16 和 13 个。

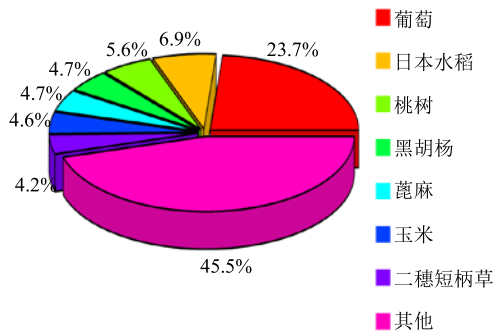


图 1 NR 库中主要物种分布

Fig. 1 Main species distribution in NR

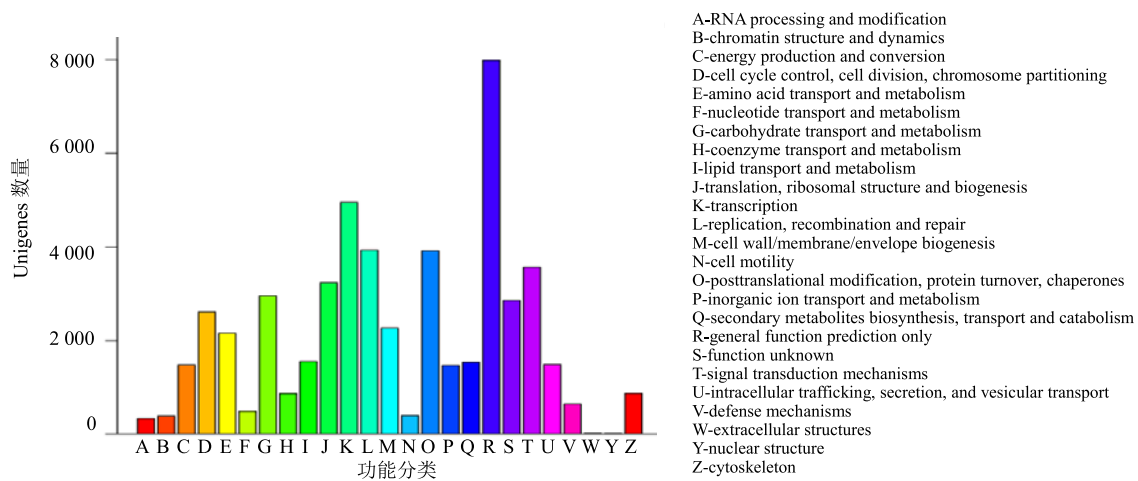


图 2 COG 功能注释分布

Fig. 2 COG functional annotation distribution

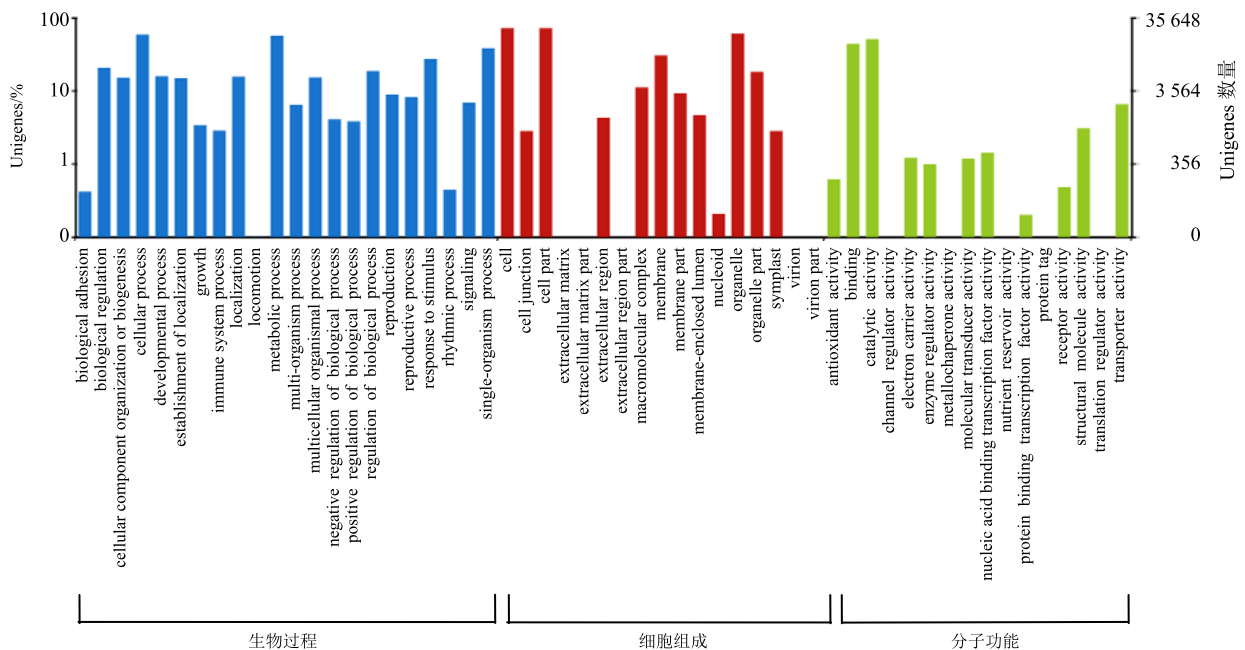


图 3 GO 注释分布结果

Fig. 3 GO classification analysis of all Unigenes

3.6 GO 注释与分类

根据 NR 注释信息, 使用 Blast2GO 软件得到 Unigene 的 GO 注释信息, 然后用 WEGO 软件对所有 Unigene 做 GO 功能分类统计, 从宏观上认识盾叶薯蓣的基因功能分布特征 (图 3)。在 GO 功能分类中有 35 648 个 Unigene 获得注释, 其中参与生物学过程 (biology process) 分类中主要集中在细胞过程 (cellular process, 20 949 个)、代谢过程 (metabolic process, 20 204 个) 和单一生物过程 (single-organism process, 13 761 个); 在细胞组分 (cellular component) 分类中主要聚集于细胞

(cell, 25 942 个)、细胞成分 (cell part, 25 942 个)、细胞器 (organelle, 21 433 个); 在分子功能 (molecular function) 分类中主要聚集于结合蛋白 (binding, 15 561 个) 和催化活性 (catalytic activity, 18 049 个)。

3.7 KEGG 注释与分类

KEGG 是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径及其功能的数据库, 利用 KEGG 可以进一步研究 Unigene 在生物学上的复杂行为。以 KEGG 数据库为参考, 可将 33 512 个基因定位到 129 个代谢通路中, 其中注释到代谢路径 (ko01100) 的

基因最多, 有 8 598 个 (25.66%), 其次, 与次生代谢途径 (ko01110) 相关的基因也较多, 有 3 830 个 (11.43%), 相关胞吞作用 (ko04144) 的基因有 1 722 个 (5.14%), 相关植物病原体相互作用 (ko04626) 的有 1 669 个 (4.98%), 相关甘油磷脂代谢 (ko00564) 与 RNA 转运 (ko03013) 的基因分别有 1 620 个 (4.83%)、1 600 个 (4.77%), 而咖啡因代谢 (ko00232)、硫辛酸代谢 (ko00785)、*D*-精氨酸和 *D*-鸟氨酸代谢 (ko00472) 相关的基因较少, 仅分别有 7、6、3 个。统计差异最显著的前 20 个通路 (表 3)。

表 3 KEGG 富集区差异最显著的前 20 个通路

Table 3 First 20 pathways with most significant differences in KEGG enrichment zone

途径	差异基因数 (占比/%)	注释基因数 (占比/%)	<i>P</i> 值	<i>Q</i> 值	途径 ID
biosynthesis of secondary metabolites	2 528 (15.41)	3 830 (11.43)	3.54×10^{-113}	4.57×10^{-111}	ko01110
metabolic pathways	4 816 (29.36)	8 598 (25.66)	1.62×10^{-52}	1.05×10^{-50}	ko01100
phenylpropanoid biosynthesis	350 (2.13)	429 (1.28)	4.02×10^{-45}	1.73×10^{-43}	ko00940
stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	294 (1.79)	360 (1.07)	2.90×10^{-38}	9.36×10^{-37}	ko00945
flavonoid biosynthesis	259 (1.58)	322 (0.96)	9.08×10^{-32}	2.34×10^{-30}	ko00941
limonene and pinene degradation	259 (1.58)	325 (0.97)	1.55×10^{-30}	3.32×10^{-29}	ko00903
flavone and flavonol biosynthesis	146 (0.89)	181 (0.54)	9.54×10^{-19}	1.76×10^{-17}	ko00944
glycolysis/gluconeogenesis	328 (2)	480 (1.43)	4.06×10^{-18}	6.54×10^{-17}	ko00010
fatty acid metabolism	177 (1.08)	231 (0.69)	4.98×10^{-18}	7.14×10^{-17}	ko00071
phenylalanine metabolism	172 (1.05)	224 (0.67)	1.01×10^{-17}	1.30×10^{-16}	ko00360
biosynthesis of unsaturated fatty acids	150 (0.91)	192 (0.57)	7.75×10^{-17}	9.09×10^{-16}	ko01040
valine, leucine and isoleucine degradation	155 (0.95)	207 (0.62)	1.94×10^{-14}	2.09×10^{-13}	ko00280
ABC transporters	299 (1.82)	450 (1.34)	3.53×10^{-14}	3.50×10^{-13}	ko02010
carbon fixation in photosynthetic organisms	190 (1.16)	266 (0.79)	6.50×10^{-14}	5.99×10^{-13}	ko00710
tryptophan metabolism	117 (0.71)	152 (0.45)	1.19×10^{-12}	1.03×10^{-11}	ko00380
pentose phosphate pathway	157 (0.96)	219 (0.65)	5.85×10^{-12}	4.72×10^{-11}	ko00030
carotenoid biosynthesis	230 (1.4)	343 (1.02)	7.59×10^{-12}	5.76×10^{-11}	ko00906
glucosinolate biosynthesis	43 (0.26)	45 (0.13)	1.19×10^{-11}	8.55×10^{-11}	ko00966
diterpenoid biosynthesis	92 (0.56)	117 (0.35)	3.65×10^{-11}	2.48×10^{-10}	ko00904
alpha-linolenic acid metabolism	105 (0.64)	138 (0.41)	5.83×10^{-11}	3.76×10^{-10}	ko00592

3.8 盾叶薯蓣根茎和叶片差异表达基因分析

以 FPKM 值的差异大于等于 2 以及 Fisher 精确检验的 *P* 值小于 0.05 为 DEGs 的筛选标准, 寻找差异基因。结果将盾叶薯蓣根茎与叶片的基因分为 3 类 (图 4), 分别为根茎相对于叶片上调的基因 (红色)、两者表达量相当的基因 (蓝色)、根茎相对叶片下调的基因 (绿色)。共筛选到 38 331 个差异基

因, 其中相对于叶片, 根茎中有 31 157 个基因上调, 有 7 174 个基因下调。

3.9 差异表达基因的 KEGG 注释

盾叶薯蓣根茎与叶片对比所得的差异表达基因经过 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。统计差异最显著的前 20 个通

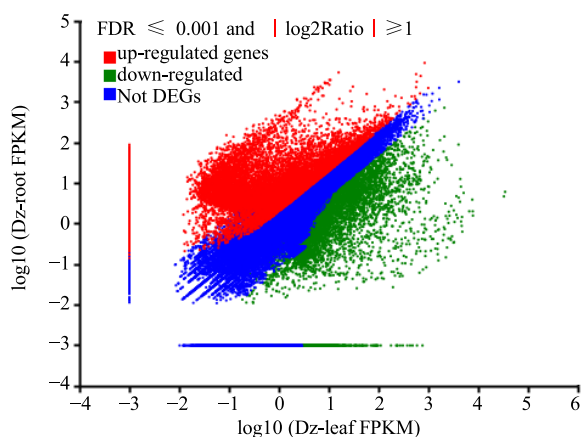


图 4 所有 Unigene 表达差异比较

Fig. 4 Comparison of all Unigenes expression

路见表 4。共有 16 402 个差异基因在 KEGG 数据库中得到注释, 占有差异基因的 52.64%; 共定位到 129 条代谢通路, 其中, 差异基因注释数目最多的 Pathway 为代谢途径 (ko01100), 有 4 816 个 (29.36%), 其次为次生代谢物的生物合成途径 (ko01110), 有 2 528 个差异基因 (15.41%), 与黄酮类化合物生物合成途径 (ko00941) 相关的差异基因有 259 个 (1.58%), 与类固醇生物合成途径 (ko00100) 相关的差异基因有 127 个 (0.77%), 与倍半萜和三萜化合物的生物合成途径 (ko00909) 相关的差异基因有 25 个 (0.15%)。

3.10 参与甾体皂苷生物合成的催化酶基因筛选

根据甾体皂苷生物合成的分子途径, 分别以现有植物物种中鉴定出的关键酶氨基酸序列为 query 序列, 利用同源 BLASTn 的方式在盾叶薯蓣转录组数据库中鉴定可能参与甾体皂苷生物合成的关键酶基因, 筛选出 29 种共 227 个可能参与甾体皂苷生物合成途径的催化酶基因, 结果共鉴定出甲羟戊酸 (MVA) 途径关键酶的 62 个转录本, 其中 46 个在盾叶薯蓣根中特异表达; 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径关键酶的 29 个转录本, 其中只有 1 个在根中特异表达; 以 IPP/DMAPP 为底物的第二阶段关键酶的 136 个转录本, 其中 84 个在根茎中特异表达 (表 4), 且 DMAPP 与 IPP 转化的 EC: 5.3.3.2 中所有基因在根茎中均呈上调表达, 这种关键酶基因的表达模式与天门冬属植物 *Asparagus* L. 和 吊 兰 属 植 物 *Chlorophytum* Ker-Gawl. 甾体皂苷合成关键酶基因的表达模式相似, 导致甾体皂苷在根中含量高, 而叶片很低。另外, 根据差异基因筛选得到 6 个甾醇 3 β -葡萄糖

基转移酶转录本, 其中 5 个来自于根茎, 在一定程度上表明葡萄糖苷化反应更集中在根茎中, 即皂苷元与糖结合生成皂苷更多的发生在根茎中, 这与前期实验发现盾叶薯蓣根茎中总皂苷的含量明显高于叶片相一致。

3.11 基因表达模式分析

为了分析基因的表达模式并验证转录组差异表达基因 FPKM 分析的可靠性, 分别选择 MEP 途径中 7 个 (DzDXR、DzCMS、DzDXS、DzCMK、DzMCS、DzHDS、DzHDR)、MVA 途径中 3 个 (DzMK、DzPMK、DzMPD)、下游途径中 3 个 (DzDHCSR24、DzUGT、DzSS) 关键酶基因, 以 Act4 为内参基因, 应用 qRT-PCR 技术测定它们在盾叶薯蓣根茎、地上茎、叶片中的相对表达量, 结果见图 5。

定量结果显示, 在 13 个关键酶基因中有 9 个 (69.23%) 与 FPKM 分析结果较一致, 包括 MEP 途径中 5 个 (DzCMS、DzMCS、DzHDS、DzHDR、DzCMK)、MVA 途径中 2 个 (DzMK、DzMPD)、下游途径中 2 个 (DzDHCSR24、DzUGT) 关键酶基因。此外, 对关键酶基因的表达模式进行分析, 发现 MEP 途径中关键酶基因在叶片与地上茎中表达量均较高, 其中有 5 个关键酶基因 (DzDXR、DzCMS、DzMCS、DzHDS、DzHDR) 在地上茎中的表达量最高, 而 DzCMS、DzHDS、DzHDR 在根茎中的表达量极低, 表明 MEP 途径的生物合成更集中在叶片与地上茎部位; 而 MVA 途径中 3 个关键酶基因的表达量特征性不明显, 在叶片与根茎中表达量差别不大; 下游途径中 3 个关键酶基因表达量在根茎中均较高, 叶片次之, 而在地上茎中表达量极低或几乎无表达, 表明下游途径的生物合成更集中在根茎中; 与转录组测序 FPKM 分析结果较一致。

4 讨论

本实验应用 HPLC 法测定盾叶薯蓣根茎与叶片中皂苷元的含量, 发现 2 个组织中皂苷元的含量具有显著性差异, 说明盾叶薯蓣中皂苷元具有明显的组织特异性。植物的表型是基因与环境共同作用的结果, 对于药材基原植物的不同部位来说, 其化学成分的差异是由基因决定的, 即基因型决定表型^[13], 故盾叶薯蓣的组织特异性是由基因及其表达的特异性决定的。本实验应用 Illumina HiSeq2000 高通量测序和生物信息学技术对盾叶薯蓣的根茎与叶片

表 4 参与皂苷元生物合成的催化酶基因的转录本

Table 4 Transcripts of enzyme genes involved in saponin biosynthesis

途径	功能注释	EC 编号	酶名称	根中转录本数	总转录本数
MVA	acetyl-CoA acetyltransferase	2.3.1.9	ATOT	19	21
	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	2.3.3.10	HMGS	6	9
	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	1.1.1.34	HMGR	14	20
	mevalonate kinase	2.7.1.36	MK	3	6
	phosphomevalonate kinase	2.7.4.2	PMK	0	1
	mevalonate pyrophosphate decarboxylase	4.1.1.33	MPD	4	5
MEP	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	2.2.1.7	DXS	1	10
	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	1.1.1.267	DXR	0	2
	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	2.7.7.60	CMS	0	1
	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	2.7.1.148	CMK	0	2
	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	4.6.1.12	MCS	0	5
	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase	1.17.7.1	HDS	0	3
下游 途径	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	1.17.1.2	HDR	0	6
	geranylgeranyl pyrophosphate synthase	2.5.1.1	GPSS	11	23
	farnesyl diphosphate synthase	2.5.1.10	FDS	5	8
	squalene synthase	2.5.1.21	SQS	4	5
	squalene monooxygenase	1.14.13.132	SQE	4	6
	cycloartenol synthase	5.4.99.8	CAS	6	18
	cycloartenol-C-24-methyltransferase	2.1.1.41	CCMT	11	12
	methylsterol monooxygenase	1.14.13.72	MMO	4	8
	cyclopropyl isomerase	5.5.1.9	CEO	1	2
	cytochrome P450, family 51 (sterol 14-demethylase)	1.4.13.70	CYPS1G1	5	7
	delta14-sterol reductase	1.3.1.70	DSR	5	6
	cholestenol delta-isomerase	5.3.3.5	CDI	2	4
	lathosterol oxidase	1.14.21.6	LSO	3	5
	7-dehydrocholesterol reductase	1.3.1.21	Dhcr-7	6	12
	delta (24)-sterol reductase	1.3.1.72	DHCR24	2	4
	sterol 3beta-glucosyltransferase	2.4.1.173	UDP-glucose	5	6
	beta-glucosidase/6-phospho-beta-glucosidase/beta-galactosidase	3.2.1.21	BGLU	10	10
合计				131	227

进行测序,共获得了 81 660 个 Unigene,有 64.33% 的 Unigene 得到功能注释;根据 FPKM 值筛选出 38 331 个差异基因,有 52.64% 的差异基因在 KEGG 中获得注释;通过差异基因 KEGG 代谢通路分析,共筛选出 29 种共 227 个可能参与甾体皂苷生物合成途径的关键酶基因,涉及萜类化合物生物合成的 MVA、MEP 途径及胆固醇的生物合成等方面;并利用 qRT-PCR 技术对 13 个酶基因的表达模式进行分析。本研究获得了盾叶薯蓣根茎与叶片的转录组信息,将活性成分的含量与基因的表达量相结合揭

示盾叶薯蓣中皂苷元的组织特异性,从转录组的角度初步揭示盾叶薯蓣中皂苷元的生物合成途径,挖掘可能参与其生物合成的关键酶基因,为有效调控盾叶薯蓣中皂苷元的生物合成、解决目前市场存在其“量大质劣”的问题奠定基础,并为引入生物细胞器或其他宿主生产皂苷元提供初步基因信息。甾体皂苷作为盾叶薯蓣中的次生代谢产物,其下游合成途径仍不清楚。现代研究表明,次生代谢产物是在形成其结构的基本骨架后,经一系列后修饰,生成最终的产物^[14],后修饰主要包括骨架的羟基化、

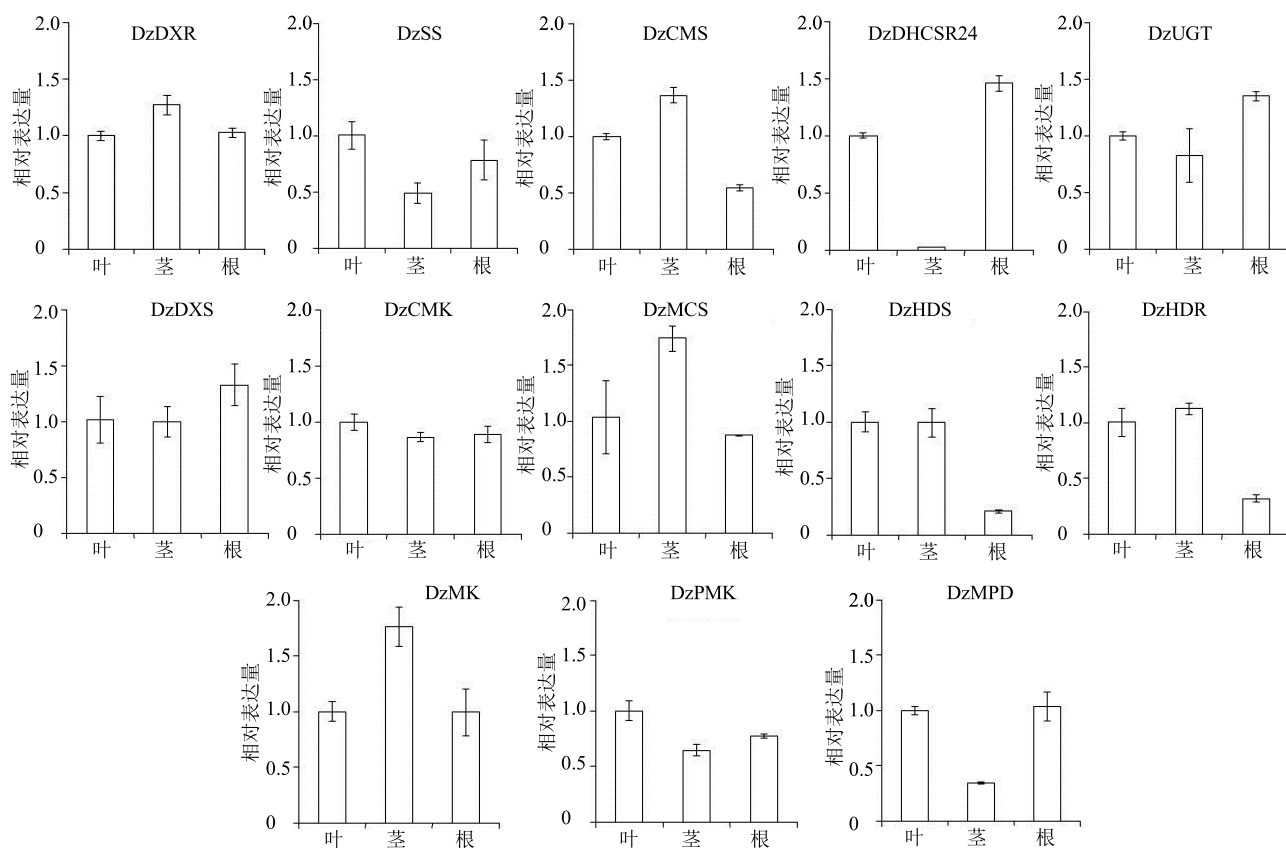


图 5 参与皂苷元生物合成途径部分相关酶基因的表达模式

Fig. 5 Expression levels of section key enzyme genes involved in saponin biosynthesis

甲基化、糖基化或者结合小分子等,由不同超基因家族编码的细胞色素 P450、糖基转移酶等多种酶催化进行。细胞色素 P450 能够在温和条件下催化多种有机化合物的氧化反应,比如药物的多种外源性和内源性化合物的代谢、三萜皂苷、类固醇的生物合成等,目前已在拟南芥、大豆、甘草、水稻^[15]等植物中克隆到了催化皂苷类成分生物合成的 P450 酶基因;本实验筛选出了 7 个甾醇 14-脱甲基酶 (CYPS1G1),属于细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 家族第 5 类中唯一的 CYP51 家族,可催化甾醇前体物质的 14 位甲基羟基化反应^[16],可能参与了盾叶薯蓣甾体皂苷的下游合成。糖基化反应是由糖基转移酶催化一些生物分子附加糖基形成共价结合的过程,家族 1 糖基转移酶一般以尿苷二磷酸-糖 (UDP-糖) 作为糖基供体,催化糖分子转移到受体分子上,从而调节受体分子的理化性质与生物活性^[17]; Saema 等^[18]发现甾醇的糖基转移酶 (SGTL1) 参与睡莲的糖基化反应,过表达 SGTL1 可增强睡莲对生物和非生物胁迫的生长和耐受性; Lu 等^[19]克隆并鉴定了一个新的糖基转移酶

(Pq3-O-UGT1),发现 Pq3-O-UGT1 是人参皂苷 Rh₂ 合成的关键酶,在 *P. quinquefolius* 原人参二醇组人参皂苷生物合成中起关键作用;本实验筛选到了 6 个 UDP 糖关键酶基因,能够催化糖基从 UDP 糖转移到受体分子上^[20],可能参与了盾叶薯蓣中皂苷元的糖基化反应。除此之外,还筛选到 7-烯胆烷醇氧化酶、7-脱氢胆固醇还原酶、 $\delta(24)$ -甾醇还原酶与甲基甾醇单加氧酶等关键酶基因,可能参与盾叶薯蓣中甾体皂苷类成分下游途径的生物合成。这些关键酶基因的挖掘对阐明盾叶薯蓣甾体皂苷的生物合成途径尤其是下游生物合成途径具有重要意义。

盾叶薯蓣根茎和叶片的转录组差异基因分析显示有 5 个差异基因为内生真菌基因,分别为 DzHMGS、DzATOT2、DzFDS、DzSS 和 DzCAS,而且内生真菌基因仅存在于根茎的转录组中。内生真菌是指某一阶段或者全部阶段生活在健康植物组织和器官内的真菌、细菌或放线菌,被感染的宿主植物不表现外在症状^[21];内生真菌在寄主细胞间生存,与寄主保持互惠共生的关系,从寄主获得氨基酸、糖类营养维持生长,同时,内生真菌参与合

成生物碱等次生代谢物提高共生体对环境适应性,增强寄主对生物和非生物胁迫的抗性^[21],并且某些内生真菌具有良好的药理活性。李昆太等^[22]采用组织块法从南方红豆杉植株中开展内生菌的分离筛选,并对内生菌的发酵产物进行分析,最终获得1株可以生产紫杉醇的内生菌;赵龙飞等^[23]对“周小麦18”设置盐胁迫、盐胁迫下接菌和对照3组处理,发现内生菌252和254可提高盐胁迫下小麦植株过氧化氢酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性,对小麦幼苗生长有一定修复作用;Ratnaweera等^[24]对仙人掌中8种内生真菌做抗菌活性研究,发现7种内生真菌至少对1种细菌显示抗性,其中最强生物活性菌被鉴定为镰刀菌;曼琼等^[25]从甘草中筛选出4株内生有效菌株JTZB006、JTZB005、JTZB063、JTZB058对痰浊阻肺模型的大鼠有较好的治疗作用,与宿主有相似的生理活性;以上研究表明内生真菌可能参与了植物次生代谢产物的合成。实验中qRT-PCR定量结果发现MVA途径中3个关键酶基因在叶片与根茎中表达量相当,而皂苷元含量测定结果则显示根茎中含量明显高于叶片,故推测这可能是盾叶薯蓣根茎中内生真菌干预的结果。那么盾叶薯蓣中的内生真菌是否参与了其皂苷类化合物的生物合成,其生物合成中的作用机制如何,盾叶薯蓣中的内生真菌是否具有和盾叶薯蓣相同的药理活性,这一系列问题的研究对于阐明皂苷类成分的生物合成途径具有重要的意义。整体观与辨证论治是我国中医药理论的主要思想。由于中药活性成分复杂,且目前质量控制方法主要侧重于化学和药理学分析,对某个或某几个化学成分进行含量测定或活性分析等“唯成分论”均不能全面反映药材质量,也不符合中药整体性的特征^[26]。随着中药现代化的推进、测序技术的进步与分析方法的完善,中药资源转录组研究逐渐成为一个新的研究热点。转录组中“组学”的概念与中医药“整体”的思想相符^[13],通过转录组数据的分析研究,可发现新的代谢通路与功能基因,挖掘有效成分代谢途径关键酶基因,研究其生物合成途径,揭示传统中药的现代生物学内涵,可为中药资源活性成分的生物合成与调控提供新的思路与方法,从而为中药的质量控制、品种选育、规范种植提供技术支撑,推动中药的现代化发展。

参考文献

[1] 谢彩侠,左春芳,白雁,等.近红外光谱技术快速测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷的含量[J].中国药房,2013,24(15):1396-1399.

[2] Laveaga G S. Uncommon trajectories: Steroid hormones, mexican peasants, and the search for a wild yam [J]. *Stud Hist Phil Biol Biomed Sci*, 2005, 36(4): 743-760.

[3] 谢彩侠,胡亚楠,左春芳,等.盾叶薯蓣质量标准[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):109-113.

[4] 汪朋.盾叶薯蓣中甾体皂苷的提取和薯蓣皂苷元绿色制备工艺研究[D].无锡:江南大学,2015.

[5] 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.

[6] 谢彩侠,崔永霞,高山林,等.盾叶薯蓣离体培养体系的建立及薯蓣皂苷元含量分析[J].中国中医药现代远程教育,2009,7(2):35-37.

[7] 张新新.盾叶薯蓣的化学成分及其药理作用研究[D].西安:西北大学,2015.

[8] Yuan S, Yan Y C, Lin H H. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2005, 80(2): 157-161.

[9] 王丽娜,王丰青,智惊宇,等.盾叶薯蓣 WRKY 转录因子的鉴定和生物信息学分析[J].中草药,2016,47(22):4062-4071.

[10] Hua W, Kong W, Cao X Y, et al. Transcriptome analysis of *Dioscorea zingiberensis*, identifies genes involved in diosgenin biosynthesis [J]. *Genes Genomics*, 2017, 39(5): 1-12.

[11] 左春芳,吕亚新,张贤良.不同产地盾叶薯蓣质量综合评价比较[J].实用医药杂志,2016,33(12):1108-1111.

[12] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles [J]. *Genome Res*, 1997, 7(10): 986.

[13] 袁媛,黄璐琦.中药资源转录组分析操作指南[M].上海:上海科学技术出版社,2016.

[14] 郭淑,罗红梅,宋经元,等.糖基转移酶在植物次生代谢途径中的研究进展[J].世界科学技术—中医药现代化,2012,14(6):2126-2130.

[15] 徐洁森,魏建和,陶韵文,等.植物细胞色素P450在三萜皂苷生物合成中的功能研究进展[J].中草药,2012,43(8):1635-1640.

[16] 孙晓梅,黄金光.禾谷镰刀菌甾醇14 α 脱甲基酶基因cDNA克隆及生物信息学分析[J].江苏农业科学,2016,44(3):31-36.

[17] 姬向楠,何非,段长青,等.植物UDP-糖基转移酶生化特性和功能研究进展[J].食品科学,2013,34(9):316-323.

[18] Saema S, Rahman L U, Singh R, et al. Ectopic overexpression of WsSGTL1, a sterol glucosyltransferase gene in *Withania somnifera*, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic

- stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(1): 195-211.
- [19] Lu C, Zhao S J, Wang X S. Functional regulation of a UDP-glucosyltransferase gene (Pq3-*O*-UGT1) by RNA interference and overexpression in *Panax quinquefolius* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2017, 129(3): 445-456.
- [20] 魏宝阳, 曹 亮, 李顺祥, 等. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 83-88.
- [21] 田 沛, 南志标. 内生真菌与寄主互惠共生的分子机制 [J]. 草业学报, 2017, 26(4): 196-210.
- [22] 李昆太, 彭卫福, 周 佳, 等. 一株产紫杉醇的南方红豆杉内生菌的分离与鉴定 [J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(1): 184-188.
- [23] 赵龙飞, 徐亚军, 赖心河, 等. 内生细菌 252 和 254 对盐胁迫下小麦幼苗过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响 [J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 2984-2992.
- [24] Ratnaweera P B, Silva E D D, Williams D E, *et al.* Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii*, and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium*, sp. [J]. *BMC Complement Alternm*, 2015, 15(1): 220.
- [25] 曼 琼, 邓 毅, 杨志军, 等. 甘草内生菌菌株对痰浊阻肺型大鼠干预作用的对比研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 161-165.
- [26] 郝 敏, 陆兔林, 毛春琴, 等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1699-1708.