

研究论文

闽双色6号籽粒发育中叶酸合成代谢基因挖掘与分析

詹鹏麟 张扬 林建新 许静 庄炜 卢和顶 陈山虎 廖长见*

(福建省农业科学院作物研究所, 玉米研究中心, 福州 350013)

摘要 叶酸是人体必需的维生素之一, 甜玉米作为一种兼具果、蔬、粮3种特性的作物, 其籽粒中叶酸含量变化及基因调控研究尚不清晰。以超甜玉米闽双色6号籽粒作为研究材料, 测定籽粒发育不同阶段的叶酸含量及基因表达, 进行Mfuzz基因时间聚类分析、基因集GO和KEGG富集分析, 挖掘潜在的叶酸合成基因及分子调控通路。结果显示, 甜玉米中叶酸含量随籽粒发育期的增长而逐渐下降, 授粉后10天至20天叶酸含量在50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 以上, 20天后呈现迅速下降的特点。基因时间序列表达模式分析获得6个类型基因集, 其中Cluster 3基因集表达趋势与叶酸含量变化相似; GO和KEGG富集分析也发现叶酸生物合成和代谢通路被Cluster 3基因集富集。19个参与甜玉米籽粒叶酸生物合成的基因被挖掘, 其中7个基因涉及以鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)为底物进行新化合物加工的生化反应通路; 此外, 发现Zm00001d031995(DHNA)、Zm00001d018733、Zm00001d023817(DHFS)和Zm00001d026549表达模式与叶酸含量变化趋势一致, Zm00001d039264和Zm00001d016866表达与叶酸含量变化趋势相反, 这表明了这6个基因可能在叶酸分子调控中起着关键作用, 该研究结果为未来高叶酸玉米育种提供潜在的基因资源。

关键词 甜玉米; 叶酸; 籽粒发育; Mfuzz聚类

Discovery and Analysis of Folate Anabolism Genes during Grain Development in Minshuangse No.6

ZHAN Penglin, ZHANG Yang, LIN Jianxin, XU Jin, ZHUANG Wei, LU Heding, CHEN Shanhu, LIAO Changjian*
(Maize Research Center, Institute of Crop Research, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract Folic acid is an essential vitamin for human body. The sweet maize is one of most important cereal crop, which has fruit, vegetable and food functional characteristic. However, the folate content and regulation genes are still unclear in sweet maize. The different kernel development stages of Minshuangse No.6 were used as materials to determine folate content and genes expression. The different expression genes were performed by Mfuzz time Cluster analysis. The Cluster genes were studied by GO and KEGG enrichment analyses, aiming to explore potential folate synthesis genes and molecular regulatory pathways. The results showed that folate content

收稿日期: 2024-10-18

接受日期: 2024-12-17

福建省科技计划项目-省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2022R1031001、2023R1031001)、福建省种业创新与产业化工程项目(批准号: zycxny2021006)和福建省科技厅-星火项目(批准号: 2023S0009)资助的课题

*通信作者。Tel: 13774514798, E-mail: liaocj1978@163.com

Received: October 18, 2024

Accepted: December 17, 2024

This work was supported by the Science and Technology Program of Fujian Province-Basic Scientific Research Projects of Provincial Public Scientific Research Institutions (Grant No.2022R1031001, 2023R1031001), the Agricultural Germplasm Resources Innovation Project of Fujian Province (Grant No.zycxny2021006), and the Fujian Provincial Science and Technology Department-Starfire Project (Grant No.2023S0009)

*Corresponding author. Tel: +86-13774514798, E-mail: liaocj1978@163.com

in sweet maize decreased gradually with the increase kernel development time. The folic acid content were above 50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ from 10 to 20 days after pollination, and showed a rapid decline after 20 days. This study obtained six Clusters by Mfuzz time Cluster analysis, among which Cluster 3 gene expression pattern had a similar trend with folate content change. The GO and KEGG enrichment analyses also revealed that the folate biosynthesis and metabolism pathways were enriched by the Cluster 3. This study found 19 genes had involved in folate biosynthesis in sweet maize, among which seven genes were involved in GTP (guanosine triphosphate) as a substrate for processing new compounds. In addition, the expression pattern of *Zm00001d031995* (*DHNA*), *Zm00001d018733*, *Zm00001d023817* (*DHFS*) and *Zm00001d026549* was consistent with the change trend of folate content. Meanwhile, the expression of *Zm00001d039264* and *Zm00001d016866* had opposited trend with folate content. Therefore, these six genes maybe play a key role in the regulation of folate molecular pathways, which provides genetic resources for high-folate breeding in sweet maize.

Keywords sweet maize; folate; kernel development; Mfuzz Cluster

叶酸(folates)是一种水溶性B族维生素,又称维生素B9,为四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF)及其一碳衍生物的统称^[1]。叶酸是动植物生命不可或缺的一种营养元素,参与生命体中一系列的生理生化反应,包括核苷酸合成、氨基酸代谢和DNA甲基化等^[2]。然而,动物自身不能重头开始合成叶酸,因此必须从植物及微生物中摄取生命所需的叶酸来维持生命活动。人体中缺少叶酸将可能诱发神经管缺陷、心血管疾病、癌症等多种出生缺陷和其他健康问题^[3]。通常成年人每天需摄入150~300 μg 叶酸来维持身体稳态,对于孕妇,需额外多摄入400 μg 叶酸以预防胎儿的生长发育缺陷^[4]。在中国,特别是贫困的农村地区,叶酸的每日膳食摄入量普遍达不到推荐的水平^[5]。

在植物体中叶酸生物合成需要经历11个步骤,这些反应分别发生在细胞质、叶绿体和线粒体中。在细胞质中合成蝶啶环,以鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)为底物,在GTP环化水解酶I(GTP cyclohydrolase I, GCHI)的作用下生成二氢新蝶呤三磷酸(dihydroneopterin triphosphate, DHN-P3);经过两步去磷酸化反应生成二氢新蝶呤(dihydroneopterin, DHN);DHN在二氢新蝶呤醛缩酶(dihydroneopterin aldolase, DHNA)的作用下生成6-羟甲基二氢蝶呤(dihydroneopterin to 6-hydroxymethyldihydropterin, HMDHP)并进入线粒体^[1,6]。HMDHP在羟甲基二氢蝶呤焦磷酸激酶(hydroxymethyldihydropterin pyrophospho kinase, HPPK)的催化下生成HMDHP-P2,此时与叶绿体中加工生成的对氨基苯甲酸(p-aminobenzoate, pABA)偶联,在二氢蝶酸合成酶(dihydropteroate

synthase, DHPS)的作用下生成二氢蝶酸(dihydropteroate, DHP),紧接着在二氢叶酸合成酶的催化下一个谷氨酸残基加到DHP上形成二氢叶酸(dihydrofolate, DHF);DHF在二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)的作用下被还原成单谷氨酸尾的四氢叶酸,在谷氨酰四氢叶酸合成酶(folylpolyglutamate synthase, FPGS)的作用下,叶酸的谷氨酸链进一步延伸生成多谷氨酰四氢叶酸。该化合物形态主要参与一碳代谢的叶酸依赖型酶促反应。但叶酸合成过程容易受环境胁迫的影响,导致叶酸提前降解为乙醛和叶酸前体化合物^[7-8]。

甜玉米是乳熟期食用新鲜果穗的鲜食玉米类型,由于其含有丰富的蛋白质、氨基酸、维生素、矿物质等营养成分,被营养学家称为“新型营养保健食品”和“长寿食品”。近年来鲜食甜玉米在中国和其他范围内的生产和消费急剧增加,尤其作为水果蔬菜的消费及食品加工原料^[9-12]。叶酸作为人体不可或缺的营养物质之一,近年来甜玉米果穗中的叶酸含量一直备受关注;美国农业部网站的数据显示,叶酸在普通新鲜甜玉米中的含量为42 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/>)。刘丰源^[5]对200份甜玉米种质资源进行叶酸含量测定,发现大部分甜玉米叶酸含量集中在40~60 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 鲜重,利用全基因组关联分析鉴定出3个与叶酸含量相关的SNP位点。江军平等^[13]对北京的甜玉米BMB380、昊白甜452、京白甜456和京双甜461进行籽粒营养物质测定,发现其蛋白质、维生素和叶酸含量均显著高于普通玉米、大米和面粉。陈新叶等^[14]对32份甜玉米杂交种籽粒不同发育期可溶性糖和叶酸含量进行测

定,发现不同类型籽粒中叶酸含量存在单峰和双峰现象。然而,甜玉米中叶酸分子调控的基因及分子调控途径至今仍报道较少。本研究利用一个超甜玉米闽双色6号,开展授粉后不同发育阶段叶酸含量测定;并进行差异表达基因的Mfuzz时间序列表达模式分析、基因功能注释和富集分析,旨在筛选和挖掘潜在的叶酸合成基因,为甜玉米叶酸生物合成提供理论基础和基因资源。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为福建省农业科学院作物研究所选育的超甜玉米品种闽双色6号(国审玉:20200523和20220577),该品种具有高产、优质、广适、高叶酸含量和抗逆等特点,在我国东南地区广泛种植^[15]。本研究试验材料种植于福建省农业科学院作物研究所农试基地。

1.2 试验方法

1.2.1 样品取样 分别对授粉后10天、15天、20天、25天和30天的闽双色6号籽粒进行取样,每个时间点取果穗中间两行籽粒10~15粒,3次生物学重复。将取好的鲜样迅速置于液氮中,保存于-80℃超低温冰箱。

1.2.2 叶酸含量测定 叶酸含量测定:采用LC-100高效液相色谱法测定,称取0.4 g样本,放入研钵中磨碎,加入2 mL的0.2%高氯酸水溶解,超声30 min,12 000 ×g离心10 min,取上清液针头式过滤器过滤后待测。利用伍丰LC-100高效液相色谱仪进行测定,走样时间为30 min,紫外检测器的波长为280 nm,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。

1.2.3 RNA提取和转录组测序 使用TaKaRa植物RNA提取试剂盒(Cat#9769)提取甜玉米籽粒发育不同时期的RNA,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA降解和污染情况;分别使用Nanophotometer分光光度计、Qubit2.0荧光计和Agilentbioanalyzer2100系统检测RNA纯度、浓度和RNA完整性;由北京诺禾致源生物科技有限公司对样品进行流程化的处理,以B73作为参考基因组,获得籽粒不同发育期差异表达基因的FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)值。在筛选差异表达基因时,以 $P < 0.05$ 且差异倍数(fold change) ≥ 2 作为差异标准^[16]。

1.2.4 基因时间序列表达模式和功能注释分析 利用R软件包Mfuzz v2.22.0对10天、15天、20天、25天和30天的基因时间序列表达模式进行分析。在聚类分析中,去除表达值在所有样本中缺失率超过25%的基因,并用平均值对表达值缺失率 $< 25\%$ 的基因表达值进行填充。同时,去除在所有样本中表达水平变化不大的基因,标准差阈值设置为0.5。对于一个给定的聚类,如果两个基因的成员度越高,它们的表达趋势就越相似,这在一定程度上代表了该基因在聚类中的重要性^[17]。对6个聚类基因集的功能特点分析。利用eggNOG-mapper v2进行GO和KEGG注释。采用TBtools进行候选基因的功能富集分析,物种设定为玉米,参数为默认值,包括最小重叠度为3, P 值设定为0.01,最小富集度为1.5。

1.2.5 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)定量分析6个潜在的叶酸合成基因 分别对闽双色6号授粉后10天、20天和30天的籽粒进行总RNA提取,第一条cDNA的反转录,按照5× All-In-One RT MasterMix试剂盒(温哥华应用生物材料有限公司)说明书步骤操作。本试验中qRT-PCR所用的反应程序参照上海翊圣生物有限公司HieffTM qPCR SYBR Green Master Mix说明书进行。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。本研究从maizeGDB网站下载基因CDS序列,利用Primer 5软件进行定量引物设计,引物序列见表1,*ZmUBI*为内参基因。

1.3 数据分析

本研究统计分析利用软件IBM SPASS statistic 20,多重比较使用的是Duncan's多重测验, $P < 0.05$ 表示数据间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 闽双色6号籽粒中叶酸含量动态变化

为探究甜玉米籽粒发育过程中叶酸含量的动态变化,分别对授粉后10天、15天、20天、25天和30天的籽粒进行叶酸含量测定。结果显示,叶酸含量随授粉时间增长而逐渐下降,在10天至20天叶酸含量保持在50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 以上,分别为53.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、52.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和52.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$;20天后叶酸含量呈现迅速下降趋势(图1A)。

2.2 不同籽粒发育期转录组表达基因相关性分析

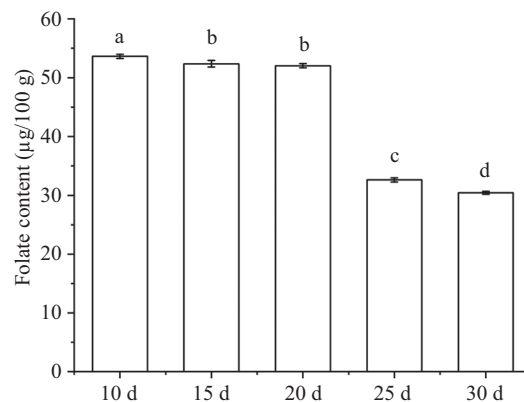
为进一步了解闽双色6号籽粒发育过程中基因表达的变化,进行样品间转录组表达基因相关性分

表1 引物序列目录
Table 1 List of the primers

引物名 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
Zm3817-F	CTC CGA CGA CGG GTT TGA C
Zm3817-R	CTC ATG ATA TTG GAC AGG AAT GCA G
Zm1995-F	GTT GGG ACA GAA GTT CGT GGT TGA C
Zm1995-R	AGG CTT GCC AAC CTT CAC TCG GAC T
Zm8733-F	GAT CCA GCA CCT CAT ACG CTC TTC T
Zm8733-R	GGA GTT AGG AGC GGA GGA GGA AGA G
Zm6549-F	AGA TGA CCC GCT TAT GTG GGG ATT C
Zm6549-R	TCT TGA TAA ATC CCA CCC CCT CTC G
Zm9264-F	AAG GAG ATG ATG AGG TCC CTG TGT A
Zm9264-R	ATG TGG TCG TCG ATG GGG AGA ACC A
Zm6866-F	CAC GGT TGA TAC TAT GAA GGC ACG A
Zm6866-R	GGA ACC TCC CAA ATG AAT CAA CAA G
ZmUBI-F	TGG TTG TGG CTT CGT TGG TT
ZmUBI-R	GCT GCA GAA GAG TTT TGG GTA CA

F: 正向引物; R: 反向引物。

F: forward primer; R: reverse primer.



a、b、c和d不同英文字母表示数据间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Different English letters a, b, c and d indicate significant differences among the data, $P < 0.05$.

图1 闽双色6号授粉后不同天数下叶酸含量动态变化

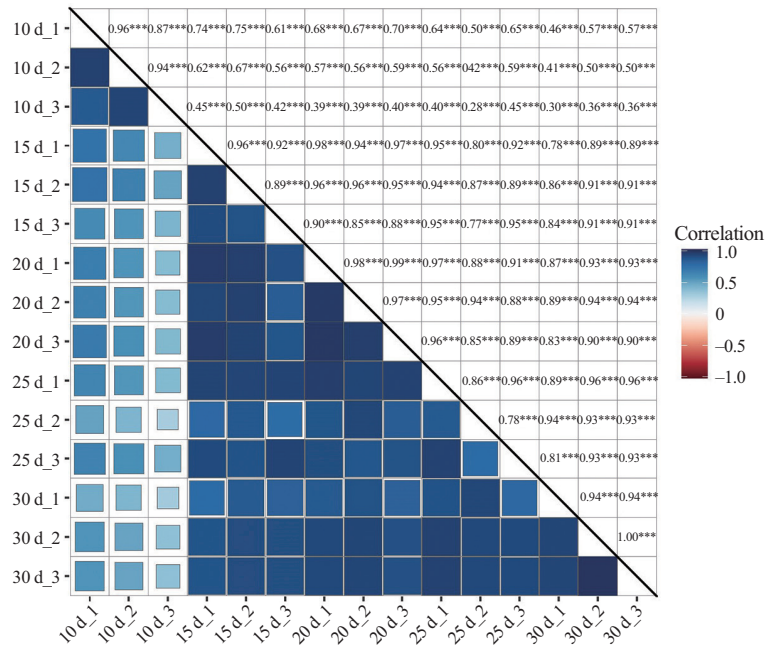
Fig.1 Dynamics of folate contents at different days after pollination of Minshuangse No.6

析。结果显示,同一时期中3次生物学重复相关性均较高,表明了样品间重复性较好。其中,授粉后10天与15天、20天、25天和30天比较发现相关性主要集中在0.5左右,表明了授粉后10天与其他时间基因表达差异较大;也说明了玉米籽粒发育中主要物质合成和降解在10天后陆续趋于平稳(图2)。

2.3 玉米籽粒发育期差异表达基因的Mfuzz聚类分析

由于玉米籽粒发育中物质积累是一个时间动态变化的过程。因此,结合各时期基因表达开展Mfuzz时间聚类分析,聚类出6个随时间变化趋势不

同的基因集群。结果显示,Cluster 1包含有6 163个表达基因,基因表达特点与发育时间呈正相关(图3A)。Cluster 2聚类了3 507个表达基因,10天表达量最高,15天后基因迅速下调表达,15天至30天差异不大(图3B)。Cluster 3聚类了3 296个表达基因,基因表达在25天前与发育时间呈负相关,25天和30天相差无异(图3C)。Cluster 4聚类了2 815个表达基因,基因集群与Cluster 2趋势相似(图3D)。Cluster 5聚类了2 662个表达基因,基因集群在10天到15天迅速表达上调,在15天达到峰值,随后逐渐下调表达(图3E)。Cluster 6聚类了2 548个表达基因,该集群与其



*** $P < 0.001$.

图2 不同时期下表达基因相关性分析

Fig.2 Correlation analysis of expressed genes under different periods

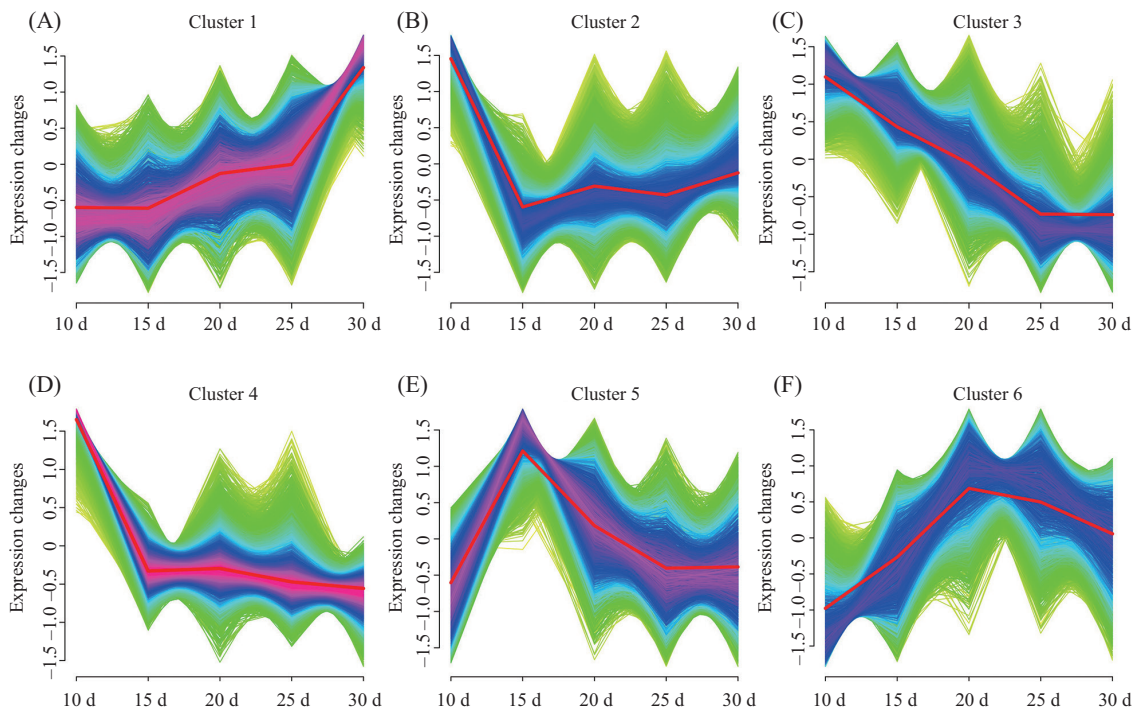


图3 6个Mfuzz聚类基因集群时间表达变化

Fig.3 Temporal expression changes in six Mfuzz Cluster genes

余5个Cluster有所不同, 在20天以前该集群逐渐上调表达, 在20天达到峰值, 随后缓慢下调表达(图3F)。综上所述, 基因表达在时间动态上存在多样性, 其中Cluster 1和Cluster 3基因集群与叶酸含量变化呈相

反趋势和相同趋势。

2.4 Cluster基因的GO富集分析

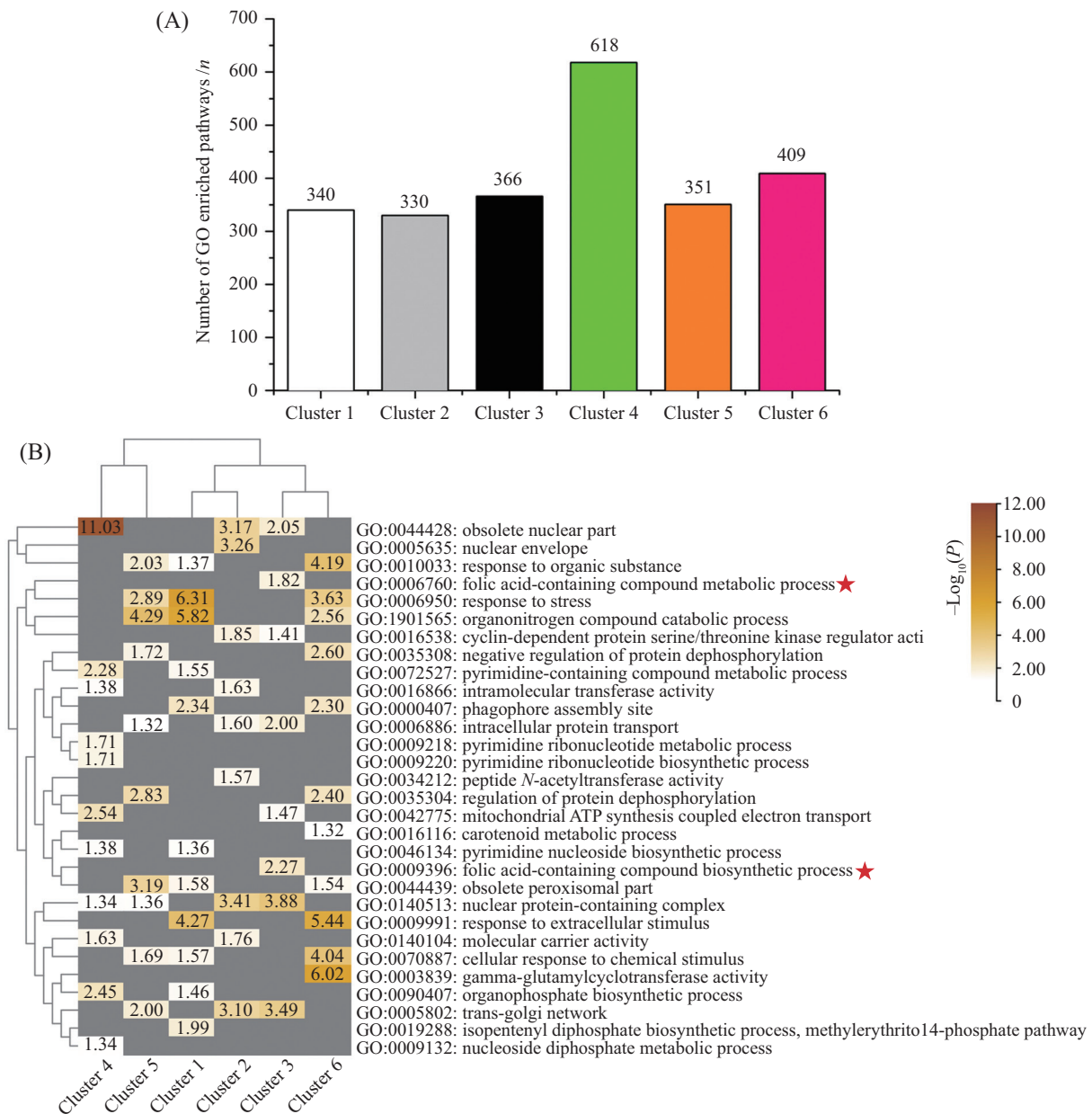
为进一步了解Cluster基因生物学功能特点, 对6个Cluster的基因集合分别进行GO富集分析。结果

显示, 总共富集了1 956个生物功能; 其中, Cluster 1至Cluster 6分别富集到340个、330个、366个、618个、351个和409个功能注释; 部分功能包含有多个Cluster基因(图4A)。富集分析 P -value排名前30的Cluster基因中发现多个Cluster基因集被富集到“GO:0010033有机物反应”、“GO:0006950胁迫响应”、“GO:1901565有机氮化合物分解代谢过程”和“GO:0140513核蛋白复合物”等生物学功能上; 值得注意的是“GO:0009396叶酸化合物的生物合成过程”和

“GO:0006760叶酸化合物的代谢过程”在Cluster 3基因集中富集(图4B)。

2.5 Cluster基因的KEGG通路富集分析

为进一步了解潜在的分子调控通路, 对6个Cluster基因集合分别进行KEGG通路富集分析。结果显示, 总共富集到122个通路; 其中, Cluster 1至Cluster 6分别富集到51个、19个、28个、35个、28个和33个通路(图5A)。对富集分析 P -value排名前25的Cluster基因通路进行分析, 发现“物质转运

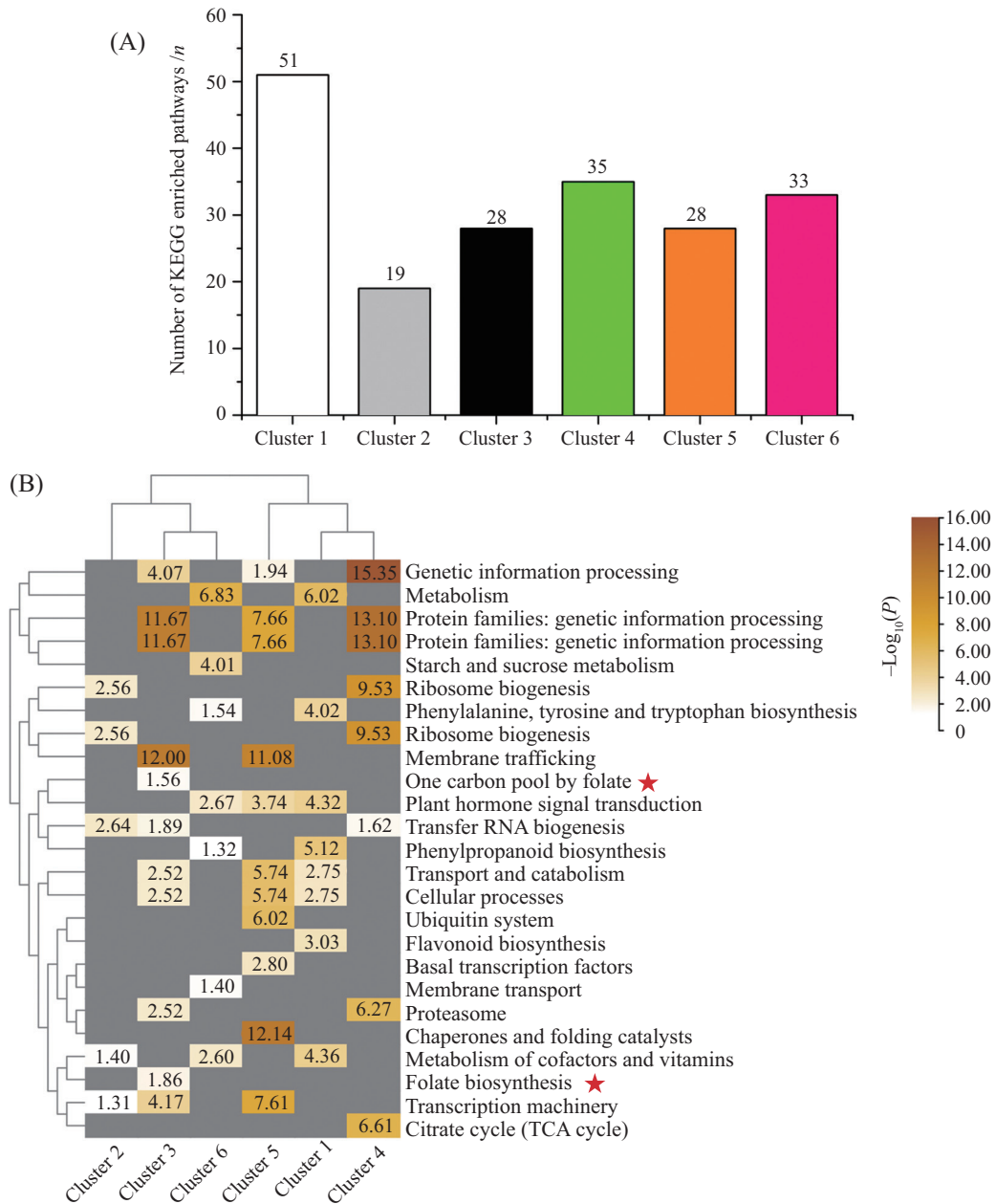


“★”表示GO富集的叶酸通路。A: 不同Cluster基因集GO富集生物学功能数量; B: 前30的GO富集的生物功能。

“★” represents GO enriched folate biological functions. A: the number of GO enrichment biological functions for different cluster genes; B: the top 30 GO enriched biological functions.

图4 Cluster基因的GO功能富集分析

Fig.4 GO functional enrichment analysis of Cluster genes



“★”表示KEGG富集的叶酸通路。A: 不同Cluster基因簇的KEGG富集生物学通路数量; B: 前25的KEGG富集的通路。

“★” represents KEGG enriched folate pathways. A: the number of KEGG enrichment biological pathways for different Cluster genes; B: the top 25 KEGG enriched biological functions.

图5 Cluster基因的KEGG通路富集分析

Fig.5 KEGG pathway enrichment analysis of Cluster genes

和分解代谢”及“细胞进程”通路同时在 Cluster 1、Cluster 3和Cluster 5基因集中富集,“植物激素信号转导”通路在Cluster 1、Cluster 5和Cluster 6基因集中富集,“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成”通路在Cluster 1和Cluster 6基因集中富集,“辅助因子和维生素的代谢”通路在 Cluster 1、Cluster 2和Cluster 6基因集中富集,其他通路也在多个Cluster基因集中富集(图 5B)。有意思的是“叶酸合成”及

“叶酸碳库”通路在Cluster 3基因集中富集,而GO生物学功能中叶酸化合物和代谢通路也富集到Cluster 3,两者结果存在一定的吻合(图 4B和图 5B),表明了玉米籽粒发育中叶酸含量变化与Cluster 3中叶酸合成基因密不可分。

2.6 甜玉米籽粒发育过程中叶酸合成调控基因表达分析

基于GO和KEGG均富集到叶酸合成通路结果,

对涉及叶酸合成调控的差异表达基因进行分析。发现19个叶酸合成调控基因在籽粒发育过程中存在表达差异(表2), 其中, *Zm00001d026531(GCH2)*、*Zm00001d031995(DHNA)*、*Zm00001d021338(HPPK)*、*Zm00001d023817(DHFS)*、*Zm00001d007318(DRTS)*和*Zm00001d036484(ADCS)*编码蛋白在前人研究中被报道参与叶酸生物合成^[18-19]。对5个发育期叶酸合成基因表达热图进行比较, 发现这些基因在不同发育期均存在不同程度的表达差异; 其中*Zm00001d031995(DHNA)*、*Zm00001d018733*、*Zm00001d023817(DHFS)*和*Zm00001d026549*在籽粒发育前期表达量较高, 随发育期增长呈现表达下降现象(图6A), 4个基因定量分析结果也与热图表达变化相吻合, 这些结果与籽粒叶酸含量变化趋势一致(图6C~图6F)。此外, *Zm00001d039264*和*Zm00001d016866*在热图中表现为籽粒前期表达量较低, 随籽粒发育成熟表达量逐渐增加(图6A), 定量结果显示与热图表达量变化相吻合, 与叶酸含量变化趋势相反(图6G和图6H); 综上所述表明甜玉米籽粒中叶酸含量变化可能与这6个基因表达量存在重要的关联作用。

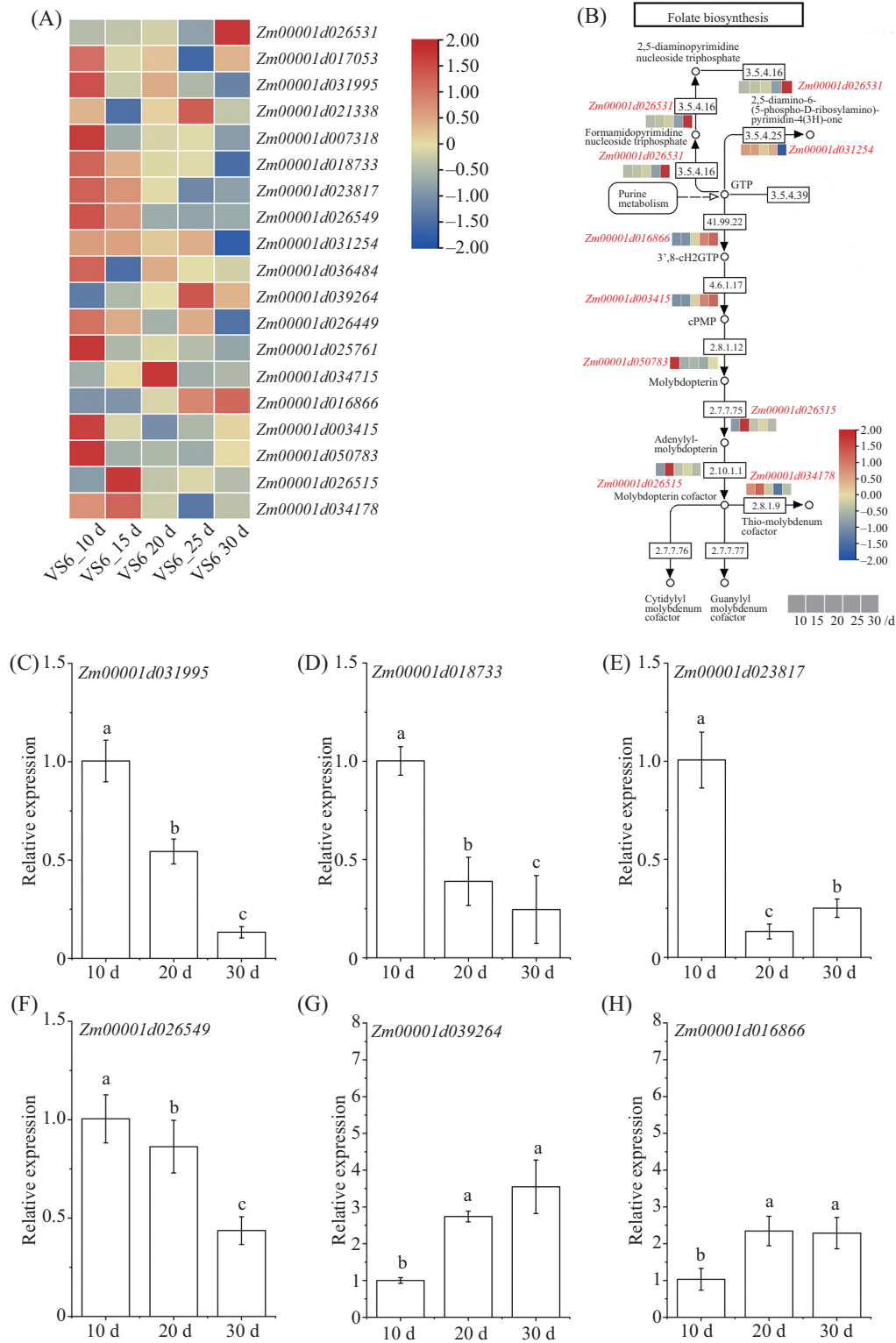
2.7 叶酸合成通路基因表达模式变化

为了解19个叶酸合成基因在通路中扮演的角色, 进行了叶酸合成通路分析, 结果发现19个基因都参与不同化合物的生物合成, 其中4个基因参与多个化合物合成, 分别是*Zm00001d026531(GCH2)*、*Zm00001d007318(DRTS)*、*Zm00001d026515(vp10)*和*Zm00001d031995(DHNA)*。*Zm00001d026531*参与甲酰胺嘧啶核苷三磷酸、三磷酸2,5-二氨基嘧啶核苷和三磷酸7,8-二氢新喋呤化合物的生物合成; *Zm00001d007318*参与叶酸、7,8-二氢叶酸和5,6,7,8-四氢叶酸化合物的生物合成; *Zm00001d026515*参与腺苷钼喋呤和钼喋呤辅因子的生物合成; *Zm00001d031995*参与7,8-二氢红花苷和7,8-二氢黄喋呤化合物的生物合成(附图1)。值得注意的是以GTP(鸟苷三磷酸)为底物进行相应化合物加工的基因在籽粒发育中均存在差异表达, 分别有*Zm00001d026531*、*Zm00001d031254*、*Zm00001d016866*、*Zm00001d003415*、*Zm00001d050783*、*Zm00001d026515*和*Zm00001d034178*(图6B)。综上所述, 筛选出的19个叶酸合成基因在甜玉米籽粒中叶酸合成和积累中

表2 叶酸合成相关基因信息

Table 2 Information of genes involved in folate synthesis

玉米基因ID Maize genes ID	染色体 Chromosome	基因名称 Genes name	编码蛋白特点 Characteristics of encoded protein
<i>Zm00001d026531</i>	10	<i>GCH2</i>	GTP cyclohydrolase 2
<i>Zm00001d017053</i>	5	Unknow	Alkaline Phosphatase D Precursor
<i>Zm00001d031995</i>	1	<i>DHNA</i>	Dihydroneopterin Aldolase 2
<i>Zm00001d021338</i>	7	<i>HPPK</i>	Folate synthesis bifunctional protein
<i>Zm00001d007318</i>	2	<i>DRTS</i>	Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase
<i>Zm00001d018733</i>	7	<i>IDP9129</i>	Folylpolylglutamate Synthase Pseudogene
<i>Zm00001d023817</i>	10	<i>DHFS</i>	Dihydrofolate Synthetase 1
<i>Zm00001d026549</i>	10	Unknow	<i>N</i> -acylphosphatidyl ethanolamine synthase
<i>Zm00001d031254</i>	1	Unknow	Monofunctional riboflavin biosynthesis protein RIBA 3
<i>Zm00001d036484</i>	6	<i>ADCS</i>	Probable Aminodeoxychorismate synthase, chloroplastic
<i>Zm00001d039264</i>	3	<i>adcl2</i>	D-amino-acid transaminase chloroplastic
<i>Zm00001d026449</i>	10	Unknow	Hypothetical protein
<i>Zm00001d025761</i>	10	Unknow	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
<i>Zm00001d034715</i>	1	<i>raf2</i>	Rubisco Accumulation factor2
<i>Zm00001d016866</i>	5	<i>cl26243_1</i>	Cyclic pyranopterin monophosphate synthase mitochondrial
<i>Zm00001d003415</i>	2	<i>LOC100282527</i>	Cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory protein mitochondrial
<i>Zm00001d050783</i>	4	Unknow	Molybdopterin Synthase Sulfur Carrier Subunit
<i>Zm00001d026515</i>	10	<i>vp10</i>	Molybdenum Cofactor Biosynthesis Protein
<i>Zm00001d034178</i>	1	Unknow	PLP (pyridoxal phosphate)-dependent transferase superfamily protein



A: 19个叶酸合成基因在籽粒发育中表达比较; B: 叶酸合成通路中参与GTP为底物进行新化合物加工的基因表达变化; C~H: qRT-PCR定量分析 *Zm00001d031995*、*Zm00001d018733*、*Zm00001d023817*、*Zm00001d026549*、*Zm00001d039264*和 *Zm00001d016866*。a、b和c不同英文字母表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异。

A: the expression of 19 folate synthesis genes were compared; B: the expression changes of genes involved in the processing of new compounds using GTP as a substrate in the folic acid synthesis pathway; C-H: qRT-PCR analysis of *Zm00001d031995*, *Zm00001d018733*, *Zm00001d023817*, *Zm00001d026549*, *Zm00001d039264* and *Zm00001d016866* expression in 10 d, 20 d and 30 d. Different english letters of a, b and c indicate significant difference at the $P < 0.05$ level.

图6 叶酸合成基因表达变化及通路分析

Fig.6 Folate synthesis gene expression changes and pathway analysis

可能扮演重要的角色。

3 讨论

叶酸作为人类从植物中摄取的重要营养元素之一,参与人体内重要遗传物质及氨基酸合成和代谢。研究发现植物生长发育旺盛的部位,叶酸含量相对较高;同时植物生长旺盛期,叶酸含量也较高^[14]。LIAN等^[20]对GEMS31和Ji63品种授粉后6、12、18、24和30天的籽粒进行叶酸的测定,发现5-甲酰四氢叶酸含量随时间增加而逐渐下降,在授粉后12天叶酸含量最高。在水稻中,对灌浆前期(S1)、灌浆中期(S2)和收获期(S3)籽粒进行叶酸含量的测定,发现叶酸含量随种子成熟度不断下降^[6]。西红柿和草莓中叶酸含量也被报道随果实发育过程增加而逐渐下降^[21-22]。本研究对超甜玉米闽双色6号授粉后10、15、20、25和30天的籽粒进行叶酸含量测定,发现随着籽粒发育的不断成熟,叶酸含量呈现逐渐下降的特点(图1A)。因此推测叶酸含量在玉米果实中随发育程度增加而逐渐下降是一种普遍现象。甜玉米最佳采收期是20~25天,为提高果穗叶酸含量,建议甜玉米品种尽量促早采收。

转录组差异表达分析已成为当今分子生物学研究的一种常规手段;通常运用于不同样品间、不同激素或胁迫处理间及转基因材料的基因表达比较分析^[23-26]。常规的转录组分析往往比较样品或处理间基因表达的差异,导致无法系统了解基因随时间动态的表达变化,容易丢失一些表达变化缓慢的重要基因。然而,差异表达基因Mufzz分析,可有效地将表达趋势相近的基因聚类一起,有效地观察基因表达随时间的动态变化,在医学研究中广泛应用^[27-28]。本研究利用甜玉米籽粒发育不同阶段的差异表达基因进行Mufzz分析,将差异表达基因分为6个Cluster基因集(图3)。结合GO和KEGG富集分析发现Cluster 3基因集中富集到叶酸合成通路;同时发现叶酸含量和Cluster 3基因表达存在相近的趋势;然而,叶酸含量变化相较于基因表达量下降更明显,可能是氨基酸和化合物合成具有一定滞后性。综上所述Cluster 3中叶酸合成基因可能与叶酸含量变化直接关联。

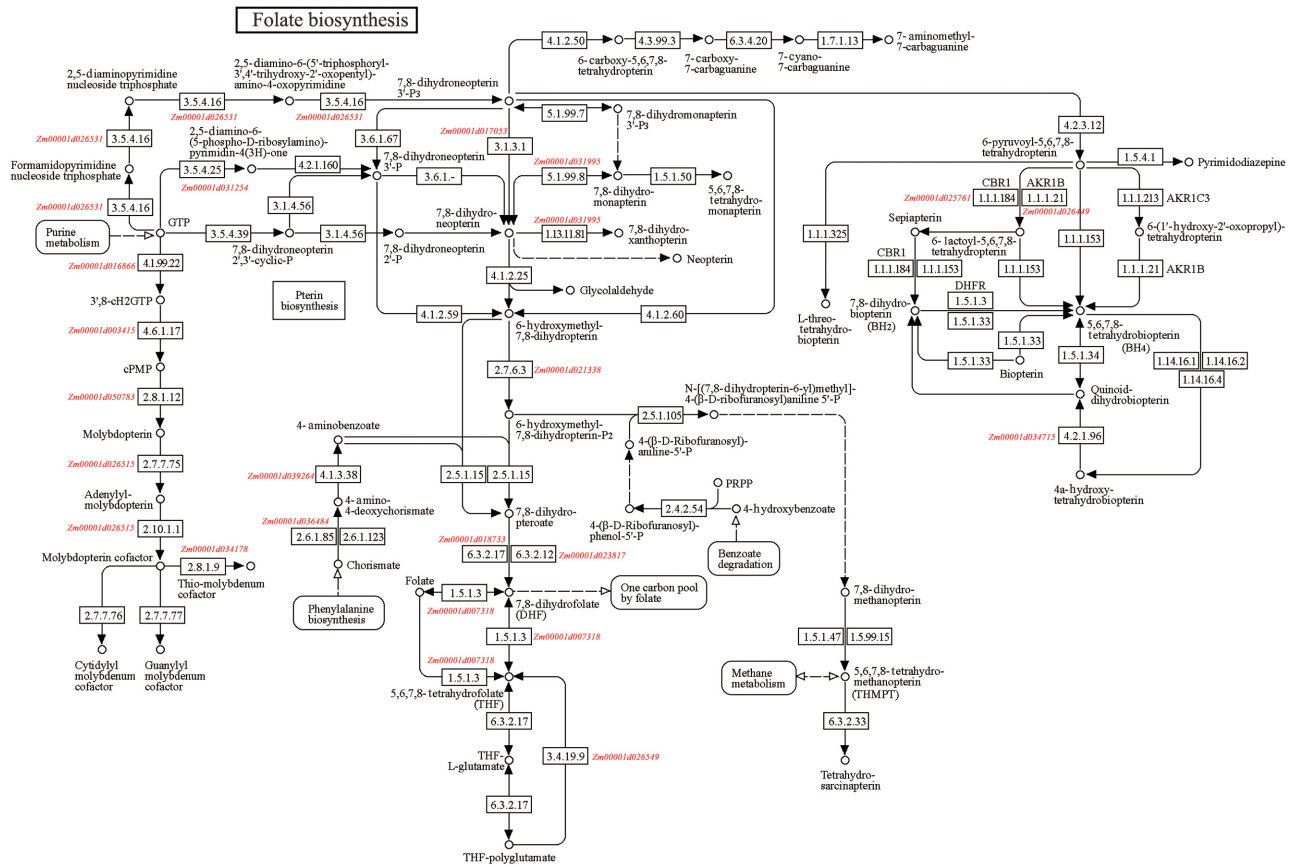
植物中叶酸合成是一个复杂的生物学过程,化合物的合成离不开叶酸合成通路的基因调控。GTPCH作为叶酸合成过程中关键的限速酶,过表

达*AtGCHI*的水稻株系中蝶啶含量提高25倍,但叶酸含量不变^[29];在拟南芥中,*AtGGH2*表达提高3倍,导致叶酸含量下降39%,相反RNAi干扰将提高叶酸含量,番茄中*LwGGH2*也有着相同的特点^[30]。*ADCS*是另一个关键限速酶基因,过表达*AtADCS*的水稻株系叶酸含量提高6倍,同时表达*AtGCHI*和*AtADCS*叶酸含量将提高100倍^[31]。在拟南芥、小麦和玉米中联合表达*GmGCHI*和*GmADCS*均明显提高叶酸含量^[31-32]。GILLIES等^[33]引入小麦的*HPPK*基因到水稻中,使水稻籽粒中的叶酸增加40%。土豆中过量表达水稻叶酸合成基因*DHFS*促使土豆的叶酸含量增加,并增强稳定叶酸水平的关键基因*FPGS*的活跃性^[34]。本研究利用转录组差异表达基因时间动态表达分析,共鉴定到19个参与叶酸合成调控的差异表达基因,其中*GCH2*、*ADCS*、*HPPK*和*DHFS*已被前人证实作为叶酸合成的关键基因(表2),表明鉴定的叶酸调控基因具有可靠性。*Zm00001d023817(DHFS)*、*Zm00001d031995(DHNA)*、*Zm00001d018733*和*Zm00001d026549*表达趋势随籽粒发育时间增长而呈现逐渐下降,荧光定量分析结果与热图表达变化相吻合,这一表达量检测结果与叶酸含量变化趋势一致(图6A,图6C~图6F);而*Zm00001d039264*和*Zm00001d016866*表达量变化与叶酸含量变化趋势相反(图6G和图6H)。因此,这6个基因可能均是潜在的叶酸合成重要基因,其基因表达变化可能直接影响叶酸含量。

参考文献 (References)

- [1] 马云,王虹.作物中叶酸合成及生物强化研究进展[J].安徽农业科学(MA Y, WANG H. Research progress on folate biosynthesis and biofortification in crops [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences), 2024, 52(6): 10-6.
- [2] GORELOVA V, DE LEPELEIRE J, VAN DAELE J, et al. Dihydrofolate reductase/thymidylate synthase fine-tunes the folate status and controls redox homeostasis in plants [J]. Plant Cell, 2017, 29(11): 2831-53.
- [3] PAPAKOSTAS G, CASSIELLO C, IOVIENO N. Folates and S-adenosylmethionine for major depressive disorder [J]. Can J Psychiat, 2012, 57(7): 406-13.
- [4] DIETER B, HANS D, XAVIER G, et al. Present and future of folate biofortification of crop plants [J]. J Exp Bot, 2014, 65(4): 895-906.
- [5] 刘丰源.高叶酸甜玉米种质资源筛选及其产品开发[D].广州:华南理工大学,2018.
- [6] 马贵芳,满夏夏,张益娟,等.谷子穗发育期转录组与叶酸代谢谱联合分析[J].作物学报(MA G F, MAN X X, ZHANG Y

- J, et al. Integrated analysis between folate metabolites profiles and transcriptome of panicle in foxtail millet [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021,47(5): 826-46.
- [7] GORELOVA V, BASTIEN O, DE CLERCK O, et al. Evolution of folate biosynthesis and metabolism across algae and land plant lineages [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5731.
- [8] SIMON S, DOMINIQUE VDS. Folate biofortification in food crops [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 44: 202-11.
- [9] 俞尧, 王翠, 关媛, 等. 甜玉米和糯玉米自交系B族维生素含量的比较分析[J/OL]. 分子植物育种(YU Y, WANG C, GUAN Y, et al. Comparative analysis of B vitamins content in Ssweet corn and waxy maize inbreds [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*), 2024-04-09.
- [10] 徐丽, 赵久然, 卢柏山, 等. 我国鲜食玉米种业现状及发展趋势[J]. 中国种业(XU L, ZHAO J R, LU B S, et al. Current situation and development trend of fresh corn seed industry in China [J]. *China Seed Industry*), 2020(10): 14-8.
- [11] SONG J, LIU C, LI D, et al. Effect of cooking methods on total phenolic and carotenoid amounts and DPPH radical scavenging activity of fresh and frozen sweet corn (*Zea mays*) kernels [J]. *Czech J Food Sci*, 2013, 31(6): 607-12.
- [12] WILLIAMS I, MARTIN M. Agronomics and economics of plant population density on processing sweet corn [J]. *Field Crop Res*, 2012, 128(2): 55-61.
- [13] 江均平, 孙艳丽, 裴志超, 等. 北京鲜食甜玉米营养成分分析与评价[J]. 中国食物与营养(JIANG J P, SUN Y L, PEI Z C, et al. Analysis and evaluation on nutritional components of fresh sweet corn in Beijing city [J]. *Food and Nutrition in China*), 2020, 26(8): 55-9.
- [14] 陈新叶, 高华洋, 王灿, 等. 不同基因型甜玉米遗传差异及叶酸和糖分含量变化[J]. 种子(CHEN X Y, GAO H Y, WANG C, et al. Genetic difference and folic acid and sugar content changes in sweet maize with different genotypes [J]. *Seed*), 2023, 42(6): 49-56.
- [15] 廖长见, 张扬, 林建新, 等. 优质、广适超甜玉米新品种闽双色6号的选育[J]. 福建农业学报(LIAO C J, ZHANG Y, LIN J X, et al. Breeding of high-quality, wide-adaptability supersweet corn, Minshuangse No.6 [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*), 2023, 38(5): 515-23.
- [16] 林静, 林建新, 张扬, 等. 利用转录组解析鲜食玉米闽甜6855的耐寒机制[J]. 华北农学报(LIN J, LIN J X, ZHANG Y, et al. Transcriptomic analysis of the cold tolerance mechanism of fresh-eating corn Mintian 6855 [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*), 2022, 37(5): 1-8.
- [17] KUMAR, LOKESH, FUTSCHIK, et al. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data [J]. *Bioinformatics*, 2007, 1(2): 5-7.
- [18] MCINTOSH S, BRUSHETT D, HENRY R. GTP cyclohydrolase 1 expression and folate accumulation in the developing wheat seed [J]. *J Cereal Sci*, 2008, 48(2): 503-12.
- [19] BLANCQUAERT D, VAN DAELE J, STOROZHENKO S, et al. 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 [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(4/5): 329-49.
- [20] LIAN T, GUO W, CHEN M, et al. Genome-wide identification and transcriptional analysis of folate metabolism-related genes in maize kernels [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 1-14.
- [21] PERIAGO M, GARCIAALONSO J, JACOB K, et al. Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2009, 60(8): 694-708.
- [22] STRALSJO L, WITTHOFT C, SJOHOLM I, et al. Folate content in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripeness, year of harvest, storage, and commercial processing [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1): 128-33.
- [23] YU Y, ZHANG H, LONG Y, et al. Plant public RNA-seq database: a comprehensive online database for expression analysis of ~45,000 plant public RNA-Seq libraries [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(5): 806-8.
- [24] 彭歆, 钱乾, 谭健韬, 等. 水稻遗传育种相关生物信息数据库和工具的研究进展[J]. 华南农业大学学报(PENG X, QIAN Q, TAN J T, et al. Research progress on bioinformatics databases and tools related to rice genetics and breeding [J]. *Journal of South China Agricultural University*), 2023, 44(6): 854-66.
- [25] DING M, DONG H, XUE Y, et al. Transcriptomic analysis reveals somatic embryogenesis associated signaling pathways and gene expression regulation in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 104(6): 647-63.
- [26] LUO Q, TENG W, FANG S, et al. Transcriptome analysis of salt-stress response in three seedling tissues of common wheat [J]. *Crop J*, 2019, 7(3): 108-22.
- [27] MAO D, ZHAI H, ZHAO G, et al. Analysis of crucial genes and pathways associated with spared nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Neural Plast*, 2020, (1):1-12.
- [28] ZENG D, YANG Y, WANG Q, et al. Transcriptome analysis of *Kluyveromyces marxianus* under succinic acid stress and development of robust strains [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, 108(1): 293.
- [29] STIRIZHENKO S, BROUWER V, VOLCKAERT M, et al. Folate fortification of rice by metabolic engineering [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 25(11): 1277-9.
- [30] AKHTAR T, ORSOMANDO G, MEHRSHAHI P, et al. A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis [J]. *Plant J*, 2010, 64(2): 256-66.
- [31] 汪冉冉. 过量表达GCHI和ADCS基因对提高植物叶酸含量的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.
- [32] LIANG Q, WANG K, LIU X, et al. Improved folate accumulation in genetically modified maize and wheat [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(5): 1539-51.
- [33] 韩娟英, 何曦, 蒋宙蕾, 等. 富含叶酸水稻研究进展[J]. 中国稻米(HAN J Y, HE X, JIANG Z L, et al. Progress on high folate content rice [J]. *China Rice*), 2017, 23(6): 7-12.
- [34] LEPELEIRE J, STROBBE S, VERSTRAETE J, et al. Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(1): 175-88.



附图1 19个叶酸合成基因参与不同化合物的生物合成

Supplement Fig.1 Nineteen folate synthesis genes involved in different compounds biosynthesis