

# 盾叶薯蓣响应低磷胁迫的生理代谢及基因表达特征分析

王庆婷<sup>1</sup>, 耿晓桐<sup>2</sup>, 李雅静<sup>3\*</sup>,  
张娟<sup>1</sup>, 刘庆普<sup>1</sup>, 龚海燕<sup>1</sup>, 雷敬卫<sup>1</sup>, 谢彩侠<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河南中医药大学 河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 郑州 450046;

<sup>2</sup>信阳农林学院, 信阳 464000; <sup>3</sup>上海中医药大学, 上海 201203

**摘要:**为探讨盾叶薯蓣在低磷胁迫下的生理变化、甾体皂苷类成分代谢及基因表达的响应特征, 本研究选取河南南阳产盾叶薯蓣进行模拟低磷胁迫实验, 在不同时期对根际基质中的磷含量(全磷、速效磷、磷酸铝盐、磷酸铁盐、磷酸钙盐)和土壤酸性磷酸酶(soil acid phosphatase, S-ACP)活性、植株根系发育特征(总根长、总投影面积、总表面积)、各部位过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及甾体皂苷类成分含量等指标进行分析, 确定盾叶薯蓣响应低磷胁迫的关键时期, 并利用 RNA-Seq 测序对关键时期盾叶薯蓣根茎、叶片、地上茎 3 个部位中的基因表达特征进行分析。研究发现低磷胁迫处理后盾叶薯蓣根际基质中易吸收态磷含量显著降低, 其抗氧化酶(POD、SOD)与酸性磷酸酶活性均显著升高, 根系发育受阻; 低磷胁迫可明显影响盾叶薯蓣中甾体皂苷的合成与积累, 且不同部位响应特征不同; 胁迫初期为盾叶薯蓣响应低磷胁迫的关键时期; 响应低磷胁迫关键时期的盾叶薯蓣基因表达存在明显的组织特异性, 对三个处理组不同部位基因表达量与代谢通路进行分析, 分别从盾叶薯蓣根茎、叶片、地上茎 3 个部位中挖掘到 239、211、237 个差异基因, 涉及萜类骨架、有机酸、肌醇的生物合成等多个代谢通路。上述研究结果说明盾叶薯蓣通过改变基因表达水平对表型性状和生理代谢过程进行调节来响应低磷胁迫, 本研究为研究盾叶薯蓣响应低磷胁迫的分子机制提供理论依据。

**关键词:**盾叶薯蓣; 低磷胁迫; 磷形态; 土壤酸性磷酸酶; 抗氧化酶; 甾体皂苷; 基因表达

中图分类号: R282; R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)9-1569-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.9.011

## Physiological metabolism and gene expression characteristics of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright under low phosphorus stress

WANG Qing-ting<sup>1</sup>, GENG Xiao-tong<sup>2</sup>, LI Ya-jing<sup>3\*</sup>,

ZHANG Juan<sup>1</sup>, LIU Qing-pu<sup>1</sup>, GONG Hai-yan<sup>1</sup>, LEI Jing-wei<sup>1</sup>, XIE Cai-xia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Henan Provincial Engineering Technology Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 4500462, China;

<sup>2</sup>Xinyang Agriculture and Forestry College, Xinyang 464000, China;

<sup>3</sup>Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract:** To investigate the physiological changes, steroidal saponins metabolism and gene expression of *D. zingiberensis* under low phosphorus stress, *D. zingiberensis* from Nanyang, Henan province was selected to simulate low phosphorus stress. The phosphorus content (total phosphorus, available phosphorus, aluminophosphate, phosphoric acid iron salt, calcium phosphate) and soil acid phosphatase (S-ACP) activities in rhizosphere matrix, root development characteristics (total root length, total projected area, total surface area), peroxidase, superoxide dismutase activities and steroid saponins contents in each tissue were analyzed at different periods. The key period of *D. zingiberensis* response to low phosphorus stress was determined, and RNA-seq sequencing was used to analyze the gene expression characteristics in roots, leaves and stems of *D. zingiberensis*. It

收稿日期: 2023-02-06

接受日期: 2023-06-29

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(20A360016)

\* 通信作者 Tel: 86-013673651577; E-mail: nanyangxcx@126.com

was found that the content of absorbable phosphorus in rhizosphere matrix of *D. zingiberensis* was significantly decreased, the activities of antioxidant enzymes (POD, SOD) and soil acid phosphatase (S-ACP) were significantly increased under low phosphorus stress, and root development was inhibited; The synthesis and accumulation of steroidal saponins in *D. zingiberensis* were obviously affected by low phosphorus stress, and the response characteristics of different parts were different; The early stage of stress is the critical period for *D. zingiberensis* to respond to the low phosphorus stress; The gene expression of *D. zingiberensis* in the critical period of low phosphorus stress showed obvious tissue specificity. The gene expression levels and metabolic pathways in different parts of the three treatment groups were analyzed, and 239, 211 and 237 differential genes were found from the root, leaf and stem of *D. zingiberensis*, respectively. It involves many metabolic pathways such as terpenoid skeleton, organic acid and inositol biosynthesis. et al. The above research results indicate that *D. zingiberensis* responded to the low phosphorus stress by regulating phenotypic traits and physiological metabolic process through changing gene expression level, which provided theoretical basis for studying the molecular mechanism of *D. zingiberensis* response to the low phosphorus stress.

**Key words:** *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; low phosphorus stress; phosphorus form; soil acid phosphatase; antioxidant enzymes; steroidal saponins; gene expression

磷作为植物生长发育所必需的大量元素之一,参与了植物的光合作用、能量转化、信号转导,以及酶活性等的调节,可以提高植物对环境的适应性<sup>[1]</sup>。植物获取磷素的主要来源为土壤,但由于土壤中的磷转移性差,极易被固定,因此其生物有效性低<sup>[2]</sup>。施用磷肥虽能够缓解有效磷的缺失,但易与土壤中的铁、铝、钙等离子或土壤颗粒结合而难以被植物摄取。此外,过度施用磷肥不仅会加剧磷矿的衰竭,还会造成周围水体富营养化的环境污染问题<sup>[3-5]</sup>。因此研究植物低磷胁迫下的响应机制,筛选并培育耐低磷品种迫在眉睫。低磷胁迫下,植物会通过表型性状和生理代谢的调节来响应低磷信号,以改变磷的存在形态,提高植物对磷的吸收率。植物根系通过分泌酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)提高根际土壤的酸性磷酸酶活性,实现对土壤中难溶性有机磷的活化利用<sup>[6]</sup>。ACP是一种能水解单磷酸酯键释放无机磷的水解酶类,一般ACP活性的增高被视为植物响应低磷胁迫的重要机制之一<sup>[7]</sup>。另外,植物的根系发育情况<sup>[8-10]</sup>及抗氧化系统<sup>[11-13]</sup>也会产生变化来响应低磷胁迫。

在漫长的生长发育过程中,植物自成一整套抗低磷的机制。低磷胁迫下,植物会通过改变一系列基因表达水平来调控自身生理生化过程,从而尽快适应低磷环境延长生存时间。转录组测序技术(RNA-Seq)可以研究组织在特定条件下的基因转录情况、定位并注释基因,是研究植物生理过程分子机理的有效手段<sup>[14]</sup>。目前RNA-Seq被广泛应用于植物响应外界胁迫的分子机制研究<sup>[15,16]</sup>,极大推动了植物抗逆分子机制的研究进展。因此利用RNA-Seq研究植物的耐低磷分子机制,对寻找植物响应低磷胁迫

的代谢通路进而筛选出响应低磷胁迫的潜在关键基因具有重要意义。

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。盾叶薯蓣为我国特有品种,是世界上薯蓣皂素含量最高的植物。盾叶薯蓣是提取薯蓣皂素重要的药源植物,同时也是合成甾体类激素药物的重要原料<sup>[17]</sup>。除此之外盾叶薯蓣还是治疗心脑血管疾病的临床用药<sup>[18]</sup>,这极大促进了盾叶薯蓣相关产业的发展。前期研究发现,长期种植盾叶薯蓣后会降低土壤有效磷含量,造成低磷胁迫,导致盾叶薯蓣植株生长发育受阻,影响其甾体皂苷类成分的合成。目前关于低磷胁迫对盾叶薯蓣生长及甾体皂苷代谢的影响还未见报道,因此,本文根据前期实验结果,选取河南南阳产盾叶薯蓣为研究对象,以无机磷分级含量、根系发育情况、根际基质酸性磷酸酶(soil acid phosphatase, S-ACP)活性、植物过氧化物酶(peroxidase, POD)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、各部位甾体皂苷类成分含量等为评价指标考察低磷胁迫下盾叶薯蓣的生理变化及甾体皂苷类成分的代谢特征,并利用转录组测序技术对关键时期盾叶薯蓣不同组织部位的基因表达特征进行分析,为进一步研究盾叶薯蓣应答低磷胁迫的分子机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

Agilent1100型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);2000ES型蒸发光散射检测器(奥特奇公司);1510型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司);SX2-18-12型马弗炉(苏州江东精密仪器有限公

司);LA-90型根系扫描仪(苏州信华特检测技术有限公司);10~100  $\mu\text{L}$ 和100~1 000  $\mu\text{L}$ 移液枪(艾本德国际贸易有限公司)。

## 1.2 试剂

乙腈(安徽天地高纯溶剂有限公司;纯度:HPLC  $\geq 99.9\%$ ;生产批号:AS1122-801-22075302);三角叶薯蓣皂苷、盾叶新苷(成都克洛玛生物科技有限公司;纯度  $\geq 98\%$ ;生产批号:CHB17051、CHB170718);薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷(成都曼思特生物科技有限公司;纯度  $\geq 98\%$ ;生产批号分别为: MUST-17090203、MUST-17100901、MUST-17110504);甲苯(烟台市双双化工有限公司;纯度  $\geq 99.5\%$ ;生产批号:20101201);酒石酸锶钾(武汉克米克生物医药技术有限公司;纯度  $\geq 99\%$ ;生产批号:11071-15-1);碳酸氢钠(天津市永大化学试剂有限公司;纯度  $\geq 99.5\%$ ;生产批号:20210506)苯酚(天津市瑞金特化学品有限公司;纯度  $\geq 99\%$ ;生产批号分别为:HG/T4367-2012);抗坏血酸(天津市恒兴化学试剂制造有限公司;纯度  $\geq 99.7\%$ ;生产批号:GB/T 15347-1994);土壤酸性磷酸酶(S-ACP)活性检测试剂盒(索莱宝生化试剂盒事业部);甲硫氨酸(上海源叶生物科技有限公司;纯度  $\geq 99\%$ ;生产批号:J15J8R39920);氮蓝四唑(山东西亚化学工业有限公司;纯度  $\geq 98\%$ ;生产批号:ST362);核黄素(北京奥博星生物技术有限责任公司;纯度  $98\% \sim 102\%$ ;生产批号:20141008);愈创木酚(天津市光复精细化工研究所;纯度  $\geq 99\%$ ;生产批号:B1227012);MiniBEST试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)。

## 1.3 样品

### 1.3.1 植物材料培养与处理

以珍珠岩、蛭石(3:1)作为培养基质,进行盆栽试验。试验设计为正常供磷(N)、中度低磷胁迫(H)、重度低磷胁迫(Z)3个处理,每个处理设置重复30次。正常供磷组以霍格兰完全营养液进行浇灌,中度低磷胁迫组与重度低磷胁迫组分别浇灌中度缺磷营养液(完全营养液中一半的磷含量)与重度缺磷营养液(剔除磷组分的完全营养液,剔除的K用KCl进行补充)。选取大小一致已有芽点的种根,栽种于不同磷处理的盆栽基质中,统一管理。分别在苗龄30 d的胁迫初期(5月30日,标记为5)、苗龄60 d的胁迫中期(6月30日,标记为6)、苗龄90 d的胁迫后期(7月30日,标记为7)进行采样,

每次采样10株。

### 1.3.2 样品采集

采集盾叶薯蓣新生根茎(R)、地上茎(S)、老根(O)、须根(FR)与叶片(L)后,清洗,用吸水纸吸干后快速用锡箔纸包装,置于液氮中,用于抗氧化酶(SOD、POD)活性实验;采集盾叶薯蓣根际基质(RM),自然风干后混匀,置于干燥器中保存,用于全磷、速效磷、磷酸铝盐(aluminophosphate, AL-P)、磷酸铁盐(phosphoric acid iron salt, Fe-P)、磷酸钙盐(calcium phosphate, Ca-P)含量和土壤酸性磷酸酶(S-ACP)活性测定;另采集单株样品,测定其根系发育特征。剩余各处理各部位样品,净制切制后置烘箱中45  $^{\circ}\text{C}$ 烘干,粉碎,过4号药典筛,置于干燥器中保存,用于盾叶薯蓣各部位甾体皂苷类成分的含量测定,各样品以“部位-采样日期-处理方式”的方式命名,如名称为S-5-Z的样品代表5月30日采集的重度低磷胁迫处理组的地上茎。

### 1.4 根际基质中各级磷含量测定

根际基质全磷的测定方法参照国家标准《土壤全磷测定法》中的氢氧化钠熔融-钼锑抗比色法;采用0.5 mol/L  $\text{NaHCO}_3$ 法测定速效磷含量<sup>[19]</sup>;无机磷(Al-P、Fe-P、Ca-P)测定方法参照Huang等<sup>[20]</sup>分级磷测定方法;根际基质的磷含量利用统计学方法对其进行分析。

### 1.5 根际基质中酸性磷酸酶(S-ACP)活性测定

称取风干混匀的根际基质0.1 g,加入0.05 mL甲苯溶液,轻摇15 min,加0.4 mL试剂1摇匀后,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱,开始计时,催化反应24 h;到时间后迅速加入1 mL试剂2充分混匀,终止催化反应。10 000 r/min室温离心10 min,取上清液10  $\mu\text{L}$ ,加入20  $\mu\text{L}$ 试剂3、4  $\mu\text{L}$ 试剂4,充分混匀,显色后再加166  $\mu\text{L}$ 蒸馏水,混匀后于室温下静置30 min,在660 nm处测定吸光度;空白管与标准管分别以10  $\mu\text{L}$ 蒸馏水和10  $\mu\text{L}$  0.5  $\mu\text{mol/mL}$ 苯酚标准液替换提取液测定吸光值。以37  $^{\circ}\text{C}$ 下中每克土壤每天释放1  $\mu\text{mol}$ 酚为一个酶活力单位,根际基质的ACP活性结果利用统计学方法对其进行分析。计算公式如下:

$$\text{ACP}(\text{U/g}) =$$

$$0.725 \times (OD_{\text{测定}} - OD_{\text{空白}}) \div (OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}) \div W$$

式中,W为根际基质的质量。

### 1.6 盾叶薯蓣根系发育测定

利用根系扫描仪对不同处理不同时期下盾叶薯

蒴的须根进行扫描,得到总根长、总投影面积与总表面积,并利用统计学方法对其进行分析。

### 1.7 盾叶薯蓣不同部位抗氧化酶(SOD、POD)活性测定

SOD活性采用氮蓝四唑光化还原法测定,POD活性采用愈创木酚法测定,实验方法参考Li<sup>[21]</sup>实验指导中的测定方法,并利用统计学方法对其进行分析。

### 1.8 盾叶薯蓣不同部位甾体皂苷类成分含量测定

#### 1.8.1 色谱条件

Athena C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);

流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;流动相为乙腈(A):水(B)梯度洗脱(0~5 min, 15% A→25% A;5~6 min, 25%→20% A;6~12 min, 20%→30% A;12~14 min, 30%→34% A;14~15 min, 34%→37% A;15~20 min, 37%→38.6% A;20~25 min, 38.6%→60% A;25~30 min, 60%→70% A;30~40 min, 70%→100% A);进样量 5 μL。蒸发光散射检测器(ELSD)参数:气体流量 2.5 L/min,漂移管温度 115 °C,增益值为 2。盾叶薯蓣甾体皂苷类成分对照品(A)与供试品(B)的 HPLC 图见图 1。

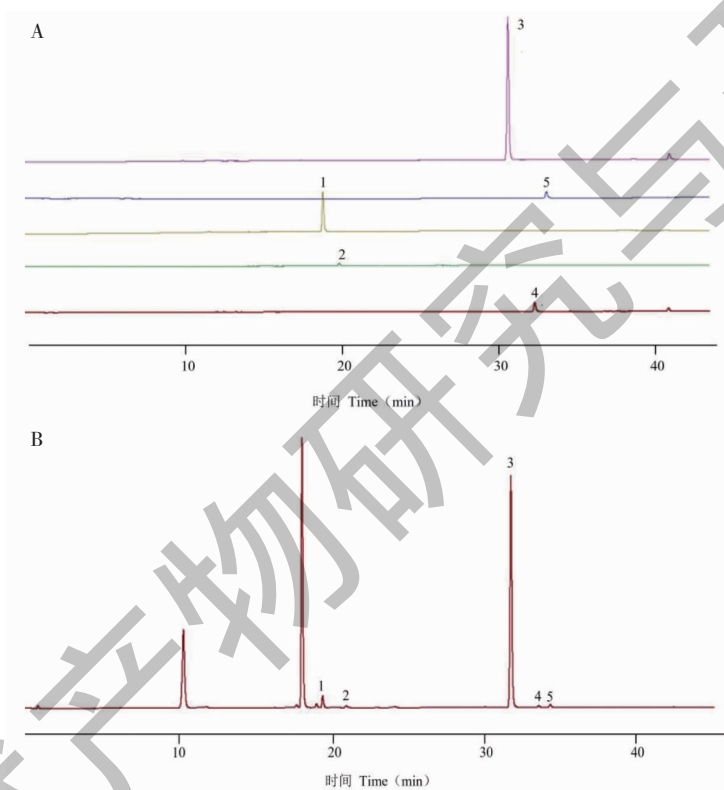


图 1 盾叶薯蓣甾体皂苷类成分对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and test substance (B) of steroidal saponins in *D. zingiberensis*

注:1. 原薯蓣皂苷;2. 伪原薯蓣皂苷;3. 盾叶新苷;4. 三角叶薯蓣皂苷;5. 薯蓣皂苷。Note: 1. Protodioscin; 2. Pseudoprotodioscin; 3. Zingiberensis newsaponin; 4. Deltonin; 5. Dioscin.

#### 1.8.2 对照品溶液和供试品溶液的制备

对照品溶液的制备:分别精密称定一定量的原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷、薯蓣皂苷对照品样品置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(色谱纯)溶解并定容制成浓度分别为 0.676、0.39、0.75、0.425、0.378 mg/mL 的对照品储备液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取盾叶薯蓣样品 0.5 g 置于具塞锥形瓶中,加入 90% 乙醇 30 mL,85

°C 加热回流 2 h,冷却至室温,用 90% 乙醇补足失重,滤纸过滤,取续滤液 20 mL 置于蒸发皿中,挥干,用甲醇(色谱纯)溶解并定容至 5 mL 容量瓶,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

#### 1.8.3 方法学考察

##### 1.8.3.1 线性关系

将 5 个对照品分别稀释后按照“1.8.1”项下色谱条件测定其峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,绘制标准曲线(见表 1)。5 种皂

表 1 5 种皂苷类成分的标准曲线及线性范围

Table 1 Standard curve and linear range of five saponin

成分 Component	线性回归方程 Linear regression equation	<i>r</i>	线性范围 Linear range (mg/L)
原薯蓣皂苷 Protodioscin	$y = 1.6108x + 3.4301$	0.9992	25.00 ~ 350.00
伪原薯蓣皂苷 Pseudoprotodioscin	$y = 1.5329x + 2.5122$	0.9994	130.00 ~ 780.00
盾叶新苷 Zingiberensis newsaponin	$y = 1.4938x + 3.5554$	0.9990	386.00 ~ 1930.00
三角叶薯蓣皂苷 Deltonin	$y = 1.0910x + 3.0029$	0.9990	11.04 ~ 276.00
薯蓣皂苷 Dioscin	$y = 1.3157x + 3.3197$	0.9991	14.88 ~ 186.00

苷类成分在各质量浓度范围内均呈现良好的线性关系。

#### 1.8.3.2 重复性、稳定性及精密度试验

精密取同一样品,按“1.8.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别进行重复性、稳定性及精密度实验,结果表明各试验的RSD均符合要求,因此该仪器的精密度和方法重复性良好,样品在24 h内稳定性良好。

#### 1.8.3.3 加样回收率试验

精密取同一样品6份,每份0.25 g,分别精密加入适量原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷、薯蓣皂苷混合对照品溶液适量,按“1.8.2”项下方法制备。按“1.8.1”项下色谱条件进样,测定原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷、薯蓣皂苷的含量,计算平均加样回收率与RSD,结果表明原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷、薯蓣皂苷的平均加样回收率分别为98.38%、99.32%、97.68%、102.33%、100.41%,RSD分别为2.38%、2.41%、2.40%、2.69%、1.77%,说明该方法可以准确测定盾叶薯蓣中5种甾体皂苷类成分的含量。

#### 1.8.4 样品测定

按上述建立的方法测定盾叶薯蓣各部位甾体皂苷类成分的含量,每个样品重复3次,测定结果取其平均值,并利用统计学方法对其进行分析。

### 1.9 盾叶薯蓣不同部位响应低磷胁迫关键时期的基因表达特征分析

#### 1.9.1 盾叶薯蓣不同部位的转录组测序及组装

选择5月30日(胁迫初期)不同处理下盾叶薯蓣的新生根茎、地上茎、叶片进行转录组分析。用MiniBEST试剂盒进行柱式法提取盾叶薯蓣3个部位的总RNA,通过NanoDrop和Agilent 2100系统检

测得到的总RNA浓度和完整性,利用提取的样品总RNA构建文库。

采用BGISEQ-500平台测定转录组样本,由测序所得的数据称为raw reads。raw reads去污染、去接头后得到clean reads,使用Trinity对合格的clean reads进行组装,然后使用Tgicl对转录本进行聚类去冗余得到Unigene。

#### 1.9.2 盾叶薯蓣不同部位的基因表达量统计、差异基因筛选、GO注释及KEGG功能分析

利用SOAP和LASTZ软件计算各基因的表达量,用FPKM表示。参照Audic等<sup>[22]</sup>基于测序的差异基因检测方法,根据基因的表达量(FPKM值)计算该基因在不同样本间的差异表达倍数,筛选出样品间的差异表达基因(DEGs)。在分析中,差异表达基因默认定义为错误发现率(false discovery rate, FDR)小于等于0.05且倍数差异在2倍以上的基因<sup>[23]</sup>。根据DEGs进行GO数据库比对和KEEN代谢通路定位分析,通过几何检验筛选差异最显著富集的前20个通路。

## 2 结果与分析

### 2.1 盾叶薯蓣响应低磷胁迫的生理变化特征

#### 2.1.1 不同处理各时期根际基质中各级磷含量和酸性磷酸酶(S-ACP)活性分析

从不同处理各时期根际基质中各级磷含量及酸性磷酸酶(S-ACP)活性的测定结果(见图2)上可看出,随着低磷胁迫程度的增加,盾叶薯蓣根际基质中各级磷含量呈下降趋势。盾叶薯蓣根际基质的速效磷含量和Ca-P在低磷胁迫过程中其含量变化不大,且各处理组速效磷含量之间的差异无统计学意义;Al-P与Fe-P作为土壤中较为活泼的磷形态,在各处理组间的含量差异较大,其含量均呈阶梯状下降趋势,根际基质中Al-P含量对低磷胁迫的响应程度大

于其他磷。由盾叶薯蓣根际基质中 S-ACP 活性可知,胁迫初期和中期 S-ACP 活性均高于胁迫后期。整个胁迫过程中重度胁迫组根际基质中的 S-ACP

活性最高,在胁迫前期和胁迫后期其 S-ACP 活性与正常组之间的差异存在统计学意义。

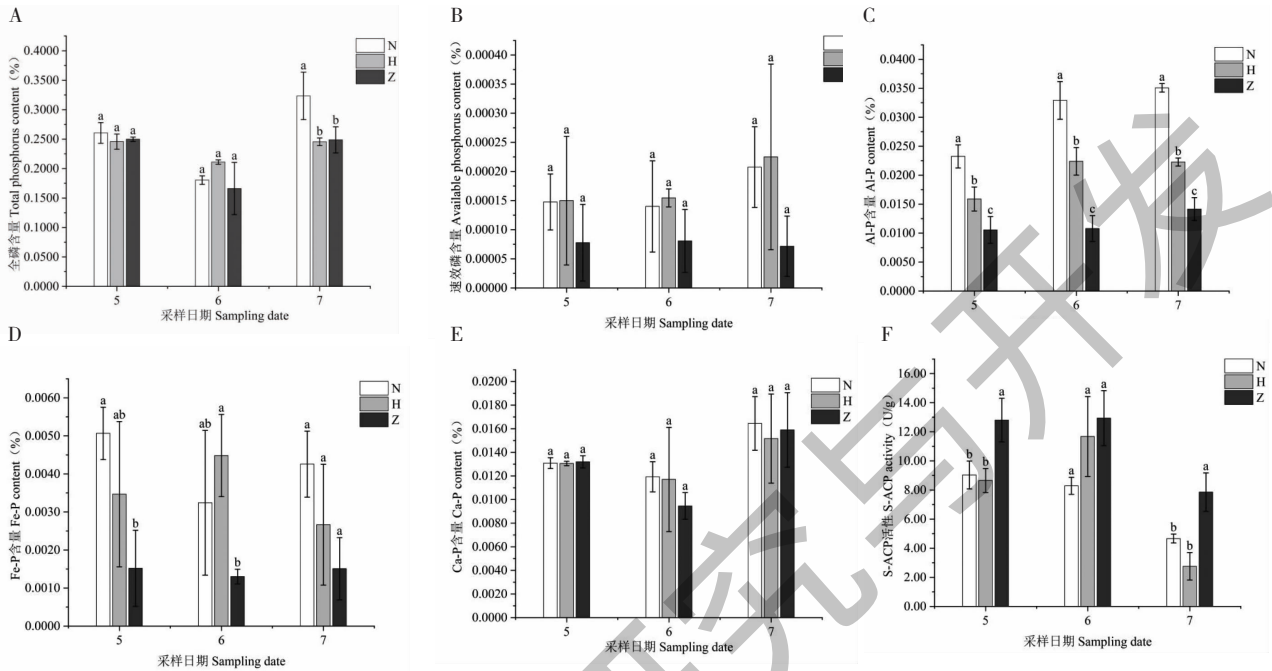


图2 不同处理各时期盾叶薯蓣根际基质中的全磷(A)、速效磷(B)、AL-P(C)、Fe-P(D)、Ca-P(E)含量及S-ACP(F)的活性

Fig. 2 Content of total phosphorus (A), available phosphorus (B), AL-P (C), Fe-P (D), Ca-P (E) and activity of S-ACP (F) in rhizosphere matrix of *D. zingiberensis* in different treatments and stages

注:同一采样时期内不同小写字母表示各磷胁迫组之间差异显著。Note: In the same sampling date, different lowercase letters indicate significant difference among phosphorus stress groups.

### 2.1.2 不同处理各时期盾叶薯蓣的根系发育情况

根系发育情况表明(见图3),重度胁迫组的须根明显稀少且呈细长状,根茎发育迟缓;胁迫中期3个处理组间的须根发育特征差异性不明显,根茎均可以发育,但重度胁迫组根茎萌发点数目相对较少;胁迫后期胁迫组处理下的须根变黄,而正常组的变化不明显,且正常组的根茎萌发点较多。根系扫描结果表明(见图4),胁迫初期重度胁迫组盾叶薯蓣的总投影面积与另外两组之间的差异存在统计学意义。总体来看,胁迫初期3个处理之间的根系发育差异性大于胁迫中后期。

### 2.1.3 不同处理各时期盾叶薯蓣各组织部位抗氧化酶(SOD、POD)的活性分析

不同处理不同时期盾叶薯蓣5个组织部位的SOD活性和POD活性变化结果表明(见表2),各处理之间盾叶薯蓣SOD及POD活性的变化呈现一定的规律性。盾叶薯蓣各组织部位中POD的活性对

低磷胁迫的响应程度大于SOD,在整个胁迫过程中,盾叶薯蓣5个组织部位各胁迫组的POD活性整体上高于正常组,其中新生根茎表现最为明显。差异性分析表明,在胁迫过程中盾叶薯蓣5个组织部位各组之间的SOD活性差异在统计学上未达显著水平,新生根茎各胁迫组以及地上茎重度胁迫组的POD活性与正常组之间的差异在统计学上达显著水平,另外,各组织部位胁迫组与正常组POD活性存在差异的表现时期不同,其中,老根主要表现在胁迫后期,须根主要表现在胁迫初期和中期,而叶片主要表现在胁迫初期和后期。

### 2.2 不同处理各时期盾叶薯蓣各部位甾体皂苷类成分的含量特征分析

盾叶薯蓣新生根茎(R)、茎部(S)、老根(O)、须根(FR)、叶片(L)中5种甾体皂苷的含量测定结果表明(见图5),甾体皂苷类成分在盾叶薯蓣植株中的分布表现出明显的组织特异性,其中新生根茎和



图3 不同处理各时期盾叶薯蓣的根系发育情况

Fig. 3 Root development of *D. zingiberensis* in different treatments and stages

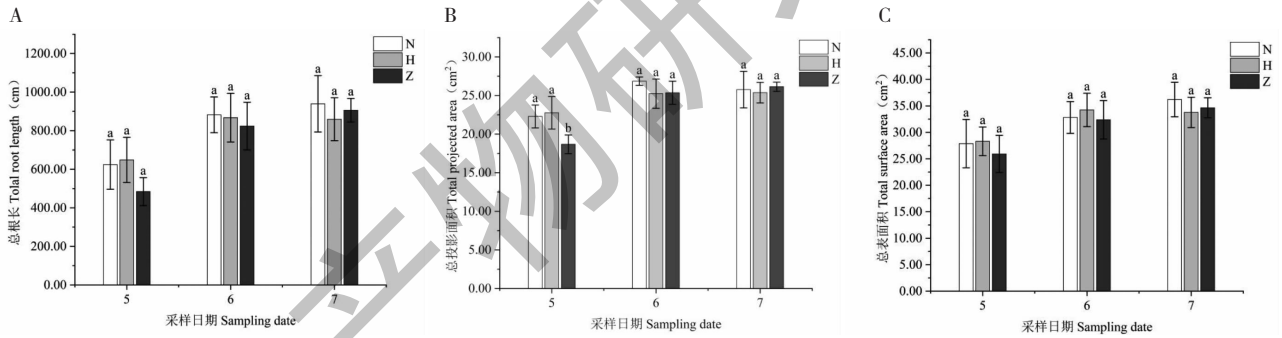


图4 不同处理各时期盾叶薯蓣须根的总根长(A)、总投影面积(B)、总表面积(C)

Fig. 4 Total root length (A), total projected area (B) and total surface area (C) of *D. zingiberensis* in different treatments and stages

注:同一采样时期内不同小写字母表示各磷胁迫组之间差异显著。Note: In the same sampling date, different lowercase letters indicate significant difference among phosphorus stress groups.

表2 不同处理各时期盾叶薯蓣5个组织部位的SOD、POD活性

Table 2 SOD and POD activity in five tissue parts of *D. zingiberensis* in different treatments and stages

分类 Classification	SOD 活性 SOD activity (U/g · FW)			POD 活性 POD activity (U/g · FW)		
	N	H	Z	N	H	Z
R-5	792.48	863.84	822.20	2 050.00	4 875.00 *	2 918.75 *
R-6	632.03	689.10	805.62	412.50	1 754.17 *	2 912.50 *
R-7	1 943.94	1 342.69 *	1 583.27	65.00	1 783.33 *	2 745.83 *
S-5	1 423.15	1 791.83	1 527.36	135.00	1 060.00	565.00 *
S-6	1 619.60	1 607.68	1 635.18	280.00	510.00	1 370.00 *

续表 2 (Continued Tab. 2)

分类 Classification	SOD 活性 SOD activity (U/g · FW)			POD 活性 POD activity (U/g · FW)		
	N	H	Z	N	H	Z
S-7	1 448.15	1 943.94	1 088.37	366.67	425.00	983.33 *
O-5	933.18	546.91	630.62	450.00	825.00	962.50
O-6	932.19	688.16	502.14	81.25	290.00	187.50
O-7	724.07	971.97	1 027.93	233.33	633.33 *	591.67 *
FR-5	460.81	490.05	622.28	1 500.00	1 395.83	6 850.00 *
FR-6	545.03	785.63 *	570.32	908.33	1 404.17	1 750.00 *
FR-7	724.07	971.97	724.07	420.83	780.00	1 108.33
L-5	1 404.99	1 511.22	1 648.42	845.00	2 100.00 *	1 825.00 *
L-6	1 792.11	1 675.07	1 596.51	987.50	1 330.00	1 204.17
L-7	1 448.15	1 943.94	1 583.27	1 337.50	3 516.67 *	3 850.00 *

注:与正常组相比, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, \*  $P < 0.05$ .

老根中均检测到原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷、薯蓣皂苷 5 种皂苷,地上茎中检测到原薯蓣皂苷和盾叶新苷 2 种皂苷,须根中检测到原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷 3 种皂苷,叶片中检测到伪原薯蓣皂苷、盾叶新苷和三角叶薯蓣皂苷 3 种皂苷。另外,各组织部位对低磷胁迫的响应特征存在差异,由差异性分析结果可知胁迫

初期盾叶薯蓣胁迫组老根、须根、叶片中甾体皂苷含量明显低于正常组,而新生根茎与地上茎中皂苷含量整体高于正常组。胁迫初期盾叶薯蓣不同部位甾体皂苷类成分含量差异较大,而胁迫中后期整体差异减小,其中根茎对低磷胁迫的响应程度大于其他组织部位。

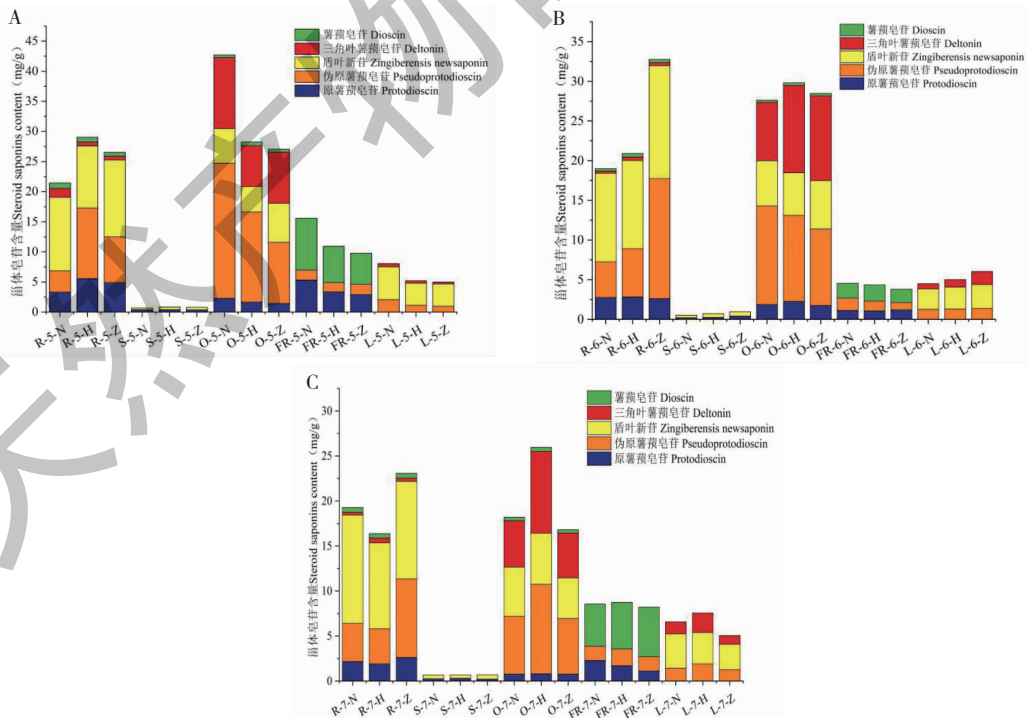


图 5 不同处理时期盾叶薯蓣不同部位 5 种甾体皂苷的含量

Fig. 5 Contents of five steroid saponins in rhizome of *D. zingiberensis* in different treatments and stages

注: A. 胁迫初期; B. 胁迫中期; C. 胁迫后期。Note: A. Early stage of stress; B. Middle stage of stress; C. Late stage of stress.



## 2.3 不同处理盾叶薯蓣胁迫初期各组织部位基因表达特征分析

低磷胁迫下盾叶薯蓣的生理代谢特征表明,胁迫初期为盾叶薯蓣响应低磷胁迫的关键时期。生理代谢是基因表达的最终表现形式,为了从基因水平上探讨盾叶薯蓣响应低磷胁迫的机制,我们利用转录组测序对胁迫初期不同处理盾叶薯蓣根茎、叶片及地上茎的基因表达特征进行分析。

### 2.3.1 转录组测序与数据组装结果分析

采用 BGISEQ-500 平台对不同处理组盾叶薯蓣根茎、叶片、地上茎共 9 个转录组样本分别测序,得到 raw reads,去污染、去接头后得到 clean reads。利用 Trinity 对质量合格的 clean reads 进行组装,9 个样本测序结果进行 de novo 组装共得到 101 593 个 Unigene,总长度为  $1.28 \times 10^8$  nt,平均长度为 1 256 nt,N50 为 1 918 nt,GC 含量为 43.67%。

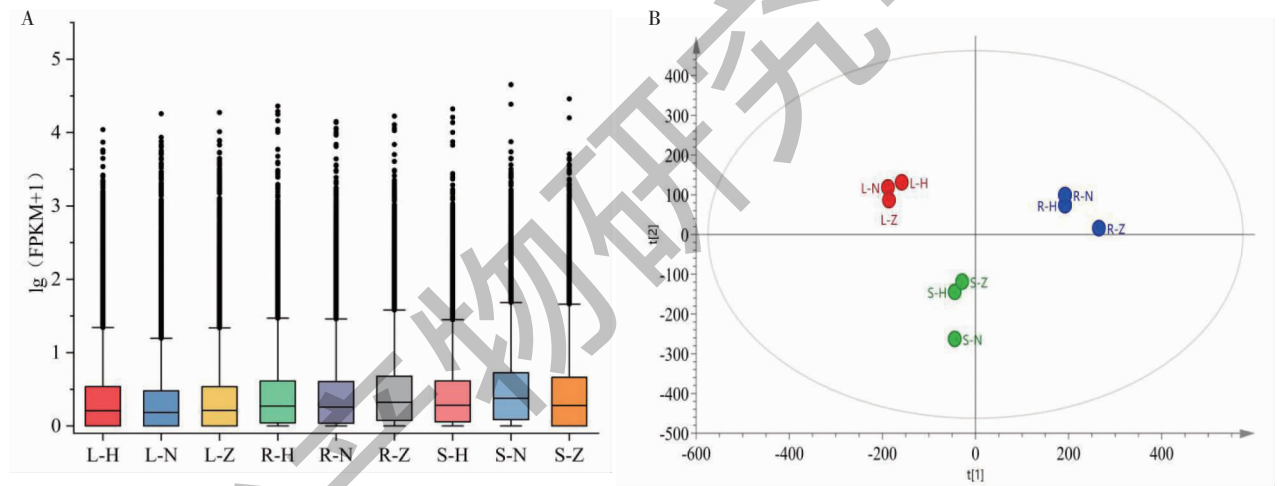


图6 盾叶薯蓣不同部位各处理基因表达量的箱线图(A)及主成分得分图(B)

Fig. 6 Boxplot (A) and principal component score chart (B) of gene expression in different parts of *D. zingiberensis*

### 2.3.4 盾叶薯蓣不同部位各处理组间差异表达基因的统计分析

由盾叶薯蓣不同部位 H 组与 Z 组(部位-H vs 部位-Z)、N 组与 Z 组(部位-N vs 部位-Z)差异基因统计结果可知(见图 7),在 L-H vs L-Z 和 L-N vs L-Z 中分别有 8 448、5 009 个基因上调表达,8 589、3 103 个基因下调表达;R-H vs R-Z 和 R-N vs R-Z 中分别有 11 591、11 739 个基因上调表达,6 374、5 802 个基因下调表达;S-H vs S-Z 和 S-N vs S-Z 中分别有 9 881、6 066 个基因上调表达,6 835、13 145 个基因下调表达。

### 2.3.2 转录组基因功能 GO 注释与分布

所有 Unigene 结果注释到 GO 数据库的细胞组成、生物过程、分子功能三个方面,有 26 090 个 Unigene 获得注释,其中参与细胞组成分类的主要集中在细胞(8 069 个)、膜部分(6 897 个)和细胞器(3 125 个);生物过程分类的主要集中在细胞过程(7 897 个)、生物调节(2 635 个)和代谢过程(2 072 个);分子功能分类的主要集中在催化活性(12 115 个)和结合蛋白(12 009 个)。

### 2.3.3 盾叶薯蓣不同部位各处理基因表达水平分析

由盾叶薯蓣不同部位各处理基因表达量的箱线图(见图 6A)可知,相同部位各处理组基因表达水平的波动较小。主成分分析(见图 6B)结果表明各处理不同部位样品基因表达存在差异,同一部位的样本各自聚集在一起,但同一部位不同处理的样品离散分布。

### 2.3.5 盾叶薯蓣各部位不同处理差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析

#### 2.3.5.1 根茎部位不同处理组差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析

根茎部位中度胁迫组与重度胁迫组(R-H vs R-Z)、正常组与重度胁迫组(R-N vs R-Z)两组对比所得差异基因在 KEGG 数据库中注释到 132 条代谢通路,对最显著富集的前 20 个通路进行分析(见图 8)。两组共同富集的代谢通路有 10 条,分别为淀粉和蔗糖代谢(ko00500)、吡啶生物碱生物合成途径(ko00901)、异黄酮生物合成途径(ko00943)、精

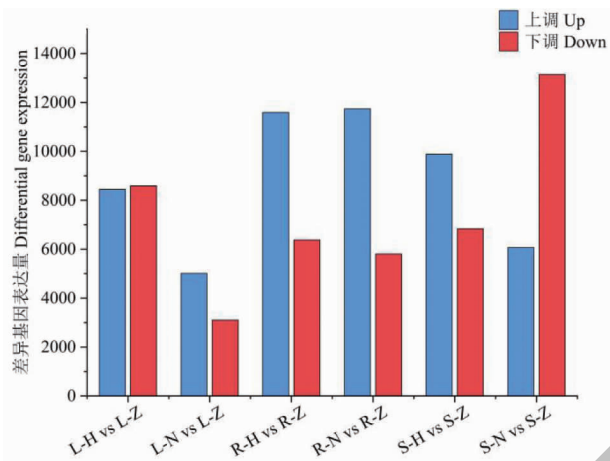


图7 盾叶薯蓣不同部位各处理组间差异表达基因的统计分析

Fig. 7 Statistical analysis of differentially expressed genes in different parts of *D. zingiberensis* and treatment groups

氨酸和脯氨酸代谢 (ko00330)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (ko00280)、光合作用-天线蛋白质 (ko00196)、叶酸生物合成 (ko00790)、氰氨基酸

(ko00460)、苯丙烷类生物合成 (ko00940)、二苯乙烯、二芳基庚烷和姜辣素的生物合成途径 (ko00945)。在重度胁迫组与中度胁迫组中,与谷

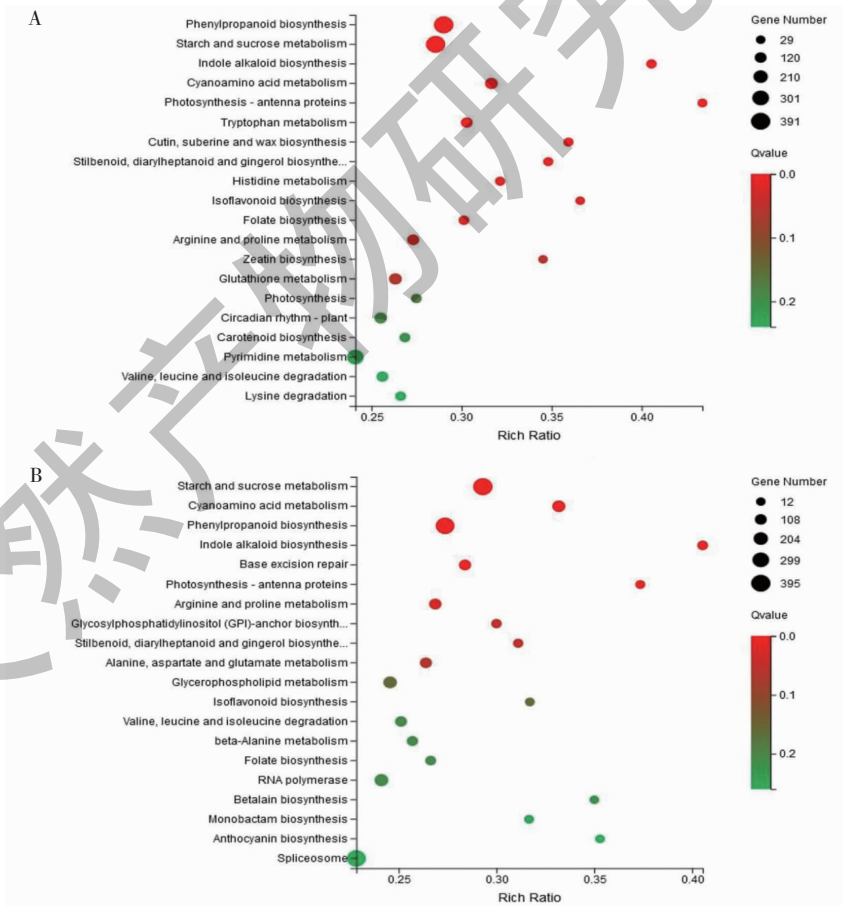


图8 盾叶薯蓣根茎不同处理组差异基因的 KEGG 代谢通路富集气泡图

Fig. 8 KEGG Pathway enrichment bubble map of differential genes in root of *D. zingiberensis* in different treatment groups

注: A. R-H vs R-Z; B. R-N vs R-Z。

胱甘肽代谢途径 (ko00480) 相关的基因有 145 个; 在重度胁迫组与正常组中, 与糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 生物合成途径 (ko00563) 相关的基因有 51 个, 与甘油磷脂代谢 (ko00564) 相关的基因有 168 个。此外, 两组均有多个差异基因富集到有机酸类物质的代谢途径。

### 2.3.5.2 叶片部位不同处理组差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析

叶片部位中度胁迫组与重度胁迫组 (L-H vs L-Z)、正常组与重度胁迫组 (L-N vs L-Z) 两组对比所得差异基因在 KEGG 数据库中注释到 132 条代谢通路, 对最显著富集的前 20 个通路进行分析 (见图

9)。两组对比共同富集的代谢通路有 6 条, 分别为磷酸戊糖途径 (ko00030), 倍半萜类化合物和三萜类化合物的生物合成 (ko00909), 硒复合代谢 (ko00450), 类黄酮生物合成 (ko00941), 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250), 淀粉和蔗糖代谢 (ko00500)。此外, 在重度胁迫组与中度胁迫组中, 有 38 个差异基因富集在倍半萜类化合物和三萜类化合物的生物合成途径 (ko00909) 中; 在重度胁迫组与正常组中, 分别有 90、73、32 个差异基因富集在磷脂酰肌醇信号系统途径 (ko04070)、肌醇磷酸代谢途径 (ko00562) 和糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 生物合成途径 (ko00563)。

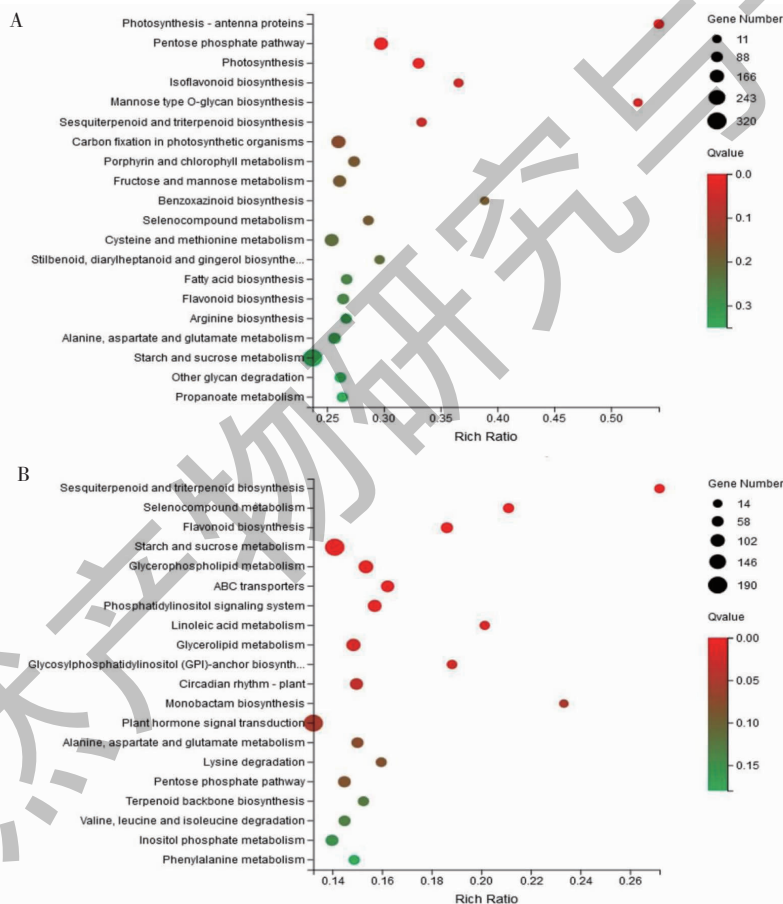


图9 盾叶薯蓣叶片不同处理组差异基因的 KEGG 代谢通路富集气泡图

Fig. 9 KEGG pathway enrichment bubble map of differential genes in *D. zingiberensis* leaves from different treatment groups

注: A. L-H vs L-Z; B. L-N vs L-Z。

### 2.3.5.3 地上茎部位不同处理差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析

地上茎部位中度胁迫组与重度胁迫组 (S-H vs S-Z)、正常组与重度胁迫组 (S-N vs S-Z) 两组对比所得差异基因在 KEGG 数据库中注释到 132 条代谢通

路, 对最显著富集的前 20 个通路进行分析 (见图 10)。两组对比共同富集的代谢通路有 11 条, 分别为甘油磷脂代谢 (ko00564), 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250), 亚油酸代谢 (ko00591), 精氨酸生物合成 (ko00220), 萜类骨架生物合成

(ko00900), 倍半萜类化合物和三萜类化合物的生物合成(ko00909), 氰氨基酸代谢(ko00460), 基础切除修复(ko03410), 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生

物合成(ko00400), 卟啉和叶绿素代谢(ko00860), 氨基酸的生物合成(ko01230)。

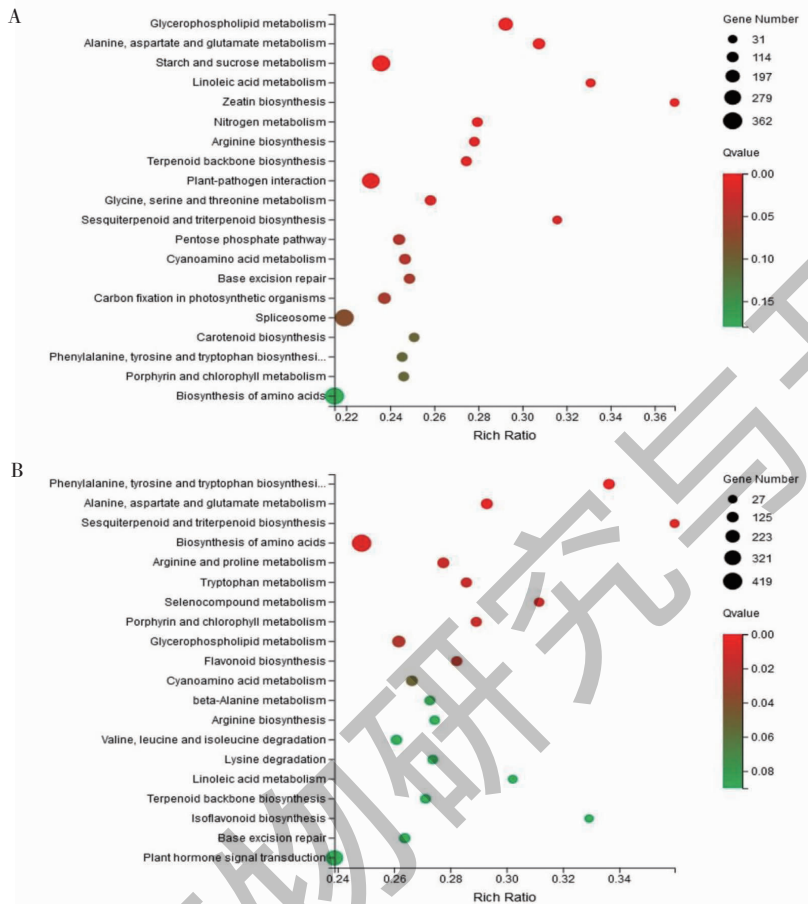


图 10 盾叶薯蓣地上茎不同处理组差异基因的 KEGG 代谢通路富集气泡图

Fig. 10 KEGG Pathway enrichment bubble map of differential genes in the stems of *D. zingiberensis* from different treatment groups  
注: A. S-H vs S-Z; B. S-N vs S-Z。

### 3 讨论与结论

植物的生长是基因与环境共同作用的结果,低磷胁迫下,植物会通过体内的信号感受器获得土壤磷缺乏的信号,通过复杂的信号转导,启动体内与低磷胁迫相关的基因表达,调控植物体内的生理生化过程,最终表现出一系列应答低磷胁迫的形态和生理生化特征<sup>[24]</sup>。本实验从盾叶薯蓣地下部分发育特征、各部位 SOD、POD 活性、根际基质 S-ACP 活性、根际基质中磷含量及形态等多个指标分析低磷胁迫不同磷浓度处理下盾叶薯蓣各部位的响应特征,研究表明,Al-P、Fe-P 与速效磷等较易被利用的磷在正常组中含量均高于重度胁迫组,尤其是 Al-P 含量在正常组、中度胁迫组、重度胁迫组依次减少,而且,盾叶薯蓣 5 个组织部位各胁迫组的 POD 活性

整体上高于正常组,3 个时期重度胁迫组根际基质酸性磷酸酶的活性均明显高于正常组,这与土壤磷缺乏时植物发生的磷饥饿响应相一致<sup>[25]</sup>;另外,研究表明,生长发育前期盾叶薯蓣对低磷胁迫的响应较为明显,后期随着盾叶薯蓣对低磷胁迫环境的适应,响应则逐渐减弱,反应特征趋于一致,这在一定程度上说明盾叶薯蓣对低磷胁迫的响应及调节是一个复杂的动态过程。

代谢调节是植物适应低磷胁迫的重要机制,甾体皂苷类成分是盾叶薯蓣主要的次生代谢产物和有效成分,本研究结果表明低磷胁迫影响盾叶薯蓣中甾体皂苷的合成,而且和生理特征的表现相同,各处理下不同部位的甾体皂苷类成分差异主要表现在胁迫初期。为了进一步从基因层面探讨盾叶薯蓣对低

磷胁迫的响应特征,本研究对胁迫初期不同处理盾叶薯蓣根茎、叶片、地上茎部位的基因表达特征进行分析,发现从三个部位中筛选到响应低磷胁迫潜在的差异基因主要涉及有机酸、肌醇、萜类骨架的生物合成及磷酸盐等多个代谢途径,这与根际基质中 S-ACP 活性增强、肌醇参与植物的信号传导和逆境调节等生命活动<sup>[26]</sup>、萜类物质在植物抵抗逆境胁迫发挥重要作用<sup>[27]</sup>、磷酸盐转运蛋白(PHT)编码基因在调节植物生长发育、根形态建成以及调节磷素平衡方面起着重要作用<sup>[28]</sup>一致。

文献研究<sup>[29]</sup>报道盾叶薯蓣中的薯蓣皂苷元主要在叶片中合成,经糖基化生成水溶性更好的皂苷后通过茎转移到根状茎中储存,说明叶片可能是皂苷类成分主要的合成部位,根茎则为储存部位,而本研究中低磷胁迫后各处理组差异基因最显著富集的前 20 个通路表明,叶片部位最显著富集的通路包括磷酸戊糖途径、倍半萜类和三萜类化合物、肌醇的生物合成等,而根茎部位最显著富集的通路则为淀粉和蔗糖代谢、吡啶生物碱生物合成途径等。研究发现<sup>[23,30]</sup>参与甾体皂苷合成的相关基因涉及到萜类化合物合成的甲羟戊酸(MVA)途径、2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径以及胆固醇生物合成途径,这也进一步证实了叶片可能是盾叶薯蓣中皂苷类成分主要的合成部位,那么叶片中和皂苷类成分合成相关的基因如何响应低磷胁迫,后期可利用实时荧光定量 qRT-PCR 技术对低磷胁迫下盾叶薯蓣叶片中筛选到的涉及萜类骨架、有机酸、肌醇的生物合成的差异基因的表达模式进行验证,进一步确定候选基因并对其进行表征与功能分析,探讨其与植物的磷饥饿响应和甾体皂苷合成之间的关联性,为研究盾叶薯蓣耐低磷的调控机制提供依据。

## 参考文献

- Zhang X, Xing Y, Liu ZX, et al. Effects of combined application of nitrogen and phosphorus fertilizer on apple rootstock seedling growth, soil inorganic phosphorus forms and phosphorus utilization[J]. J. Soil Water Conserv(水土保持学报), 2021, 35: 237-242.
- Wang X, Li HG, Cheng LY, et al. Advances of root-soil interface effect of phosphorus and water interaction and mechanisms of their efficient use[J]. Plant Nutr Fert Sci(植物营养与肥料学报), 2017, 23: 1054-1064.
- Wang SP, Wang JC, Yao LR, et al. Morphological characteristics and apase activity of wheat roots under low phosphorus stress[J]. J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报), 2021, 56: 69-76.
- Chen J, Wei SP, Liang PF, et al. Evaluation and screening of sainfoin germplasm with low phosphorus tolerance[J]. Chin J Grassland(中国草地学报), 2022, 44: 72-80.
- Zhang SW, Zhao LL, Chen C, et al. Growth and physiological response of 3 different provenances of *Pueraria lobate* under low phosphorus stress[J]. J Agric Sci Technol(中国农业科技导报), 2022, 24: 71-82.
- Zhang D, Deng X, Zhang Q, et al. Changes of phosphatase and phosphorus in apple-pear orchard soils with different planting years and soil layer[J]. J Agric Sci Yanbian Univ(延边大学农学学报), 2020, 42: 8-14.
- Huang J, Zhang LZ, Xing YF, et al. Effects of low phosphorus stress on the growth and acid phosphatase activity of *Macrotyloma uniflorum* from Yazhou[J]. Acta Agrestia Sin(草地学报), 2021, 29: 1462-1468.
- Yang L, Zhang XJ, Wu C, et al. Morphological construction and photosynthetic changes of *Hippophae rhamnoides* L. root system under low phosphorus induction[J]. J Green Sci Technol(绿色科技), 2022, 24: 14-17.
- Pan XY, Li JB, Chen Y, et al. Response of root morphology and anatomical structure of six alfalfa cultivars to phosphorus deficiency[J]. Acta Agrestia Sin(草地学报), 2021, 29: 2494-2504.
- Liu YX, Luo JJ, Lei J, et al. Screening of phosphorus efficiency germplasm and analysis of root morphology responding to phosphorus deficiency in *Stylosanthes guianensis*[J]. Acta Agrestia Sin(草地学报), 2021, 29: 876-883.
- Wang JP, Liao L, Liu GD, et al. Effects of low phosphorus stress on the growth and antioxidant system of *Stylosanthes*[J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2021, 42: 2875-2880.
- Wang F, Wang YF, Xu XX, et al. Physiological response and related genes expression of maize seedlings under low phosphorus stress[J]. J Maize Sci(玉米科学), 2021, 29: 77-84.
- Ouyang ZY, Chen WB, Ouyang SL, et al. Effects of low phosphorus stress on physiological characteristics of *Cyclobalanopsis gilva* seedling leaves[J]. J Cent South Univ Forest Technol(中南林业科技大学学报), 2021, 41: 69-79.
- Li JD, Li ZY, Cong RC. Transcriptome sequencing and preliminary analysis of willow under NaCl stress[J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2020, 18: 2835-2841.
- Lu L, Yang SY, Liu WD, et al. To explore the transcription factor in response to low temperature stress in *Nicotiana glauca* by transcriptome sequencing[J]. Bul Bot Res(植物研究), 2021, 41: 119-129.

- 16 Xu Y, Chen JL, Chen YM, et al. Transcriptome and miRNA sequencing of peanut and related genes expression under drought stress [J]. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2021, 49:1-9.
- 17 Xie CX, Zhu XL, Zuo CF, et al. Study of influence factors on content of effective component in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 20:90-93.
- 18 Tao XS, Chen ZH, Xie CX, et al. Establishing a method for rapid detection of three saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright based on HPLC and NIRS [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:305-316.
- 19 Bao SD. *Soil Agricultural Chemistry Analysis* (土壤农化分析) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- 20 Huang BB. Soil phosphorus characteristics analysis of Chinese fir plantation in different soil forming rock [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2017.
- 21 Li HS. *Plant Physiology and Biochemistry Experiment* (植物生理生化实验原理和技术) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:267-268.
- 22 Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles [J]. *Genome Res*, 1997, 7:986-995.
- 23 Li YJ, Wang FQ, Xie CX, et al. Analysis of transcriptome of *Dioscorea zingiberensis* and excavation of key enzyme genes of saponin biosynthesis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49:3885-3894.
- 24 Chen SS, Huang XQ. Plant functional traits and the factors influencing them in the islands of eastern China [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2018, 38:7699-7707.
- 25 He M, Xu QY, Xia Y, et al. Plant phosphorus acquisition mechanisms and their response to global climate changes [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2023, 47:291-305.
- 26 Yang N, Zhang J, Wang L, et al. Research progress in myo-inositol and its metabolic key enzyme genes with plant stress response mechanism [J]. *J Ludong Univ: Nat Sci* (鲁东大学学报: 自科版), 2017, 33:321-325.
- 27 Dong YM, Zhang WY, Ling ZY, et al. Advances in transcription factors regulation on plant terpene biosynthesis [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2020, 55:340-350.
- 28 Sun H, Liang H, Zhang YY. Response of root morphogenesis of medicinal plants to low phosphorus stress and molecular mechanism [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47:6573-6580.
- 29 Song W. Functional analysis of DzSE, DzCAS and DzDXR involved in diosgenin biosynthesis in *Dioscorea zingiberensis* [D]. Wuhan: Wuhan University (武汉大学), 2019.
- 30 Liang Q. Construction of transcriptome database of *Dioscorea zingiberensis* and comparative transcriptome analysis identifies putative genes involved in dioscin biosynthesis [D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences (Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences) (中国科学院大学(中国科学院武汉植物园)), 2018.