文章编号:1000-7601(2024)01-0043-11 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2024.01.05

不同品质青稞种子的广泛靶向代谢组学研究

黄海皎,李 杨,高小丽,拉巴扎西,田朋佳,
尼玛央宗,常子慧,廖文华

(西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏 拉萨 850000)

摘 要:通过测定蛋白质、淀粉、β-葡聚糖和 γ-氨基丁酸等品质指标含量,从 81 个西藏青稞种质资源中挑选出 3 种不同品质级别的青稞:品质较好的为比如青稞,品质中等的为曲水青稞,品质较差的为巴日白青稞,利用 LC-MS/MS 对不同品质的青稞种子中代谢物的变化进行研究。结果表明:比如青稞和巴日白青稞(56 个代谢物上调,206 个下调)、比如青稞和曲水青稞(179 个上调,82 个下调)、曲水青稞和巴日白青稞(58 个上调,240 个下调)差异表达显著的代谢物总数分别为 262、261、298。差异倍数分析发现,和巴日白青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是酚酸类物质;和曲水青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是花青素类物质;和巴日白青稞相比,曲水青稞上调的代谢物主要是黄酮碳糖苷类物质。代谢通路富集分析结果表明,和品质较差的青稞相比,品质较好青稞的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成、类黄酮生物合成等通路富集显著。和品质中等的青稞相比,品质较好青稞上调的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成和 2-氧代环戊烷羧酸甲酯代谢等通路显著富集;和品质较差的青稞相比,品质中等青稞的差异代谢物共富集在 61 条代谢通路上,主要是黄酮和黄酮醇的生物合成、嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨酰生物合成。

关键词:青稞;品质;代谢组学;LC-MS/MS;差异代谢物

中图分类号:S512.3 **文献标志码**:A

Broadly targeted metabolomics study of highland barley seeds of different qualities

HUANG Haijiao, LI Yang, GAO Xiaoli, LABA Zhaxi, TIAN Pengjia,
NIMA Yangzong, CHANG Zihui, LIAO Wenhua

(*Institute of Agriculture*, *Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences*, *Lhasa*, *Tibet* 850000, *China*)

Abstract: Three representative highland barley of good quality, medium quality and poor quality were selected from 81 Tibetan highland barley according to the content of quality indexes (protein, starch, β-glucan, γ-aminobutyric acid). 'Biru' highland barley was selected as the good quality, 'Qushui' highland barley was selected as the medium quality and 'Baribai' highland barley was selected as the poor quality. The changes of metabolites in barley seeds of different quality were studied by LC-MS/MS. The total number of differentially expressed metabolites between 'Biru' and 'Baribai' (56 up-regulated, 206 down-regulated), 'Biru' and 'Qushui' (179 metabolites up-regulated, 82 down-regulated), 'Qushui' and 'Baribai' (58 up-regulated, 240 down-regulated) was 262, 261 and 298, respectively. Difference fold analysis found that phenolic acids was the main metabolite of the high quality compared with the low quality, and anthocyanins was the main metabolites of the high quality compared with the medium quality. The results of metabolic pathway enrichment analysis showed that the differential metabo-

收稿日期:2023-04-24 **修回日期**:2023-10-02

基金项目:第二次青藏高原综合科学考察研究植物多样性可持续利用与评估子课题(2019QZKK0502);国家作物种质资源库运行项目(NCGRC-2023-28);西藏自治区重点研发项目(XZ202201ZY0013N);西藏自治区财政专项(XZNKYNYS-2023-C-009);西藏自治区农牧科学院农业研究所统筹项目(2021-XZNYS-TCXM-0004)

作者简介:黄海皎(1986-),男,西藏拉萨人,硕士,副研究员,主要从事资源鉴定、评价及利用研究。E-mail:huanghj19861203@163.com

通信作者:廖文华(1972-),男,西藏拉萨人,硕士,研究员,主要从事种质资源搜集、评价利用及作物育种研究。E-mail:lwh197272@163.com

lites of high quality were enriched in 65 pathways, mainly in amino acid biosynthesis, aminoacyl biosynthesis and flavonoid biosynthesis. Compared with medium quality, the up-regulated differential metabolites of high quality were enriched in 65 pathways, mainly in amino acid biosynthesis, aminoacyl biosynthesis and 2-oxy-cyclopentane methyl ester metabolism. Compared with the low quality, the differential metabolites of medium quality were enriched in 61 pathways, mainly including biosynthesis of flavonoids and flavonols, purine metabolism, pyrimidine metabolism and aminoacyl biosynthesis.

Keywords: highland barley; qualities; metabolomics; LC-MS/MS; differential metabolites

青稞(*Hordeum vulgare* L.)是世界第四重要的谷类作物,也是唯一可在高海拔地区、短生长季节正常成熟的谷类作物[1]。青稞是藏区农牧民不可替代的主粮,也是主要饲料和酿造业等农产品加工业的重要原料[2]。青稞主要种植在东亚国家,其在中国主要分布于包括四川、甘肃、青海和西藏等在内的青藏高原地区,我国青稞产量占全球青稞总产量77%[3]。青稞营养价值高,富含蛋白质、多酚、维生素、酚类、β-葡聚糖和黄酮类化合物等[4],其中酚类物质为天然抗氧化剂,在抗癌、抗衰老、预防心血管疾病、提高免疫力等方面发挥独特的生理功效[5];β-葡聚糖含量对预防心血管疾病、糖尿病等有明显效果[6]。青稞富含膳食纤维,其可溶性纤维和总纤维含量均高于其他谷类作物,粗脂肪含量平均为2.31%,比玉米和燕麦低[7]。目前,关于青稞的研究主要集中于其遗传多样性分析、营养成分研究、海拔差异和加工方式对青稞品质的影响、分子生物学特征分析、品种改良等方面[8],不同品质青稞的代谢组学研究较为有限。

代谢组学技术作为次生代谢物定量定性分析和基因功能分析等方面的研究技术,是生物学研究的主要方向。随着数据库的不断积累和生物信息学快速发展,该技术已广泛应用于植物抗病性研究、优良品种培育等方面,可从多层面、多角度解析植物的生理特征[9]。代谢物是植物体生理状态和代谢水平的直接体现者,不同物种、组织与不同环境下,植物体内的代谢物存在明显差异。植物代谢组学基于不同层面分析显著差异代谢物的积累模式,绘制代谢调控网络图,找出差异代谢通路上的差异基因,研究其功能与作用机理,在提高作物产量、品质以及对胁迫的应答方面具有重要价值[10]。Ma 等[11]和许国旺等[12]开展了青蒿中萜类物质代谢途径的研究,从青蒿挥发油中鉴定出 300 多个重要化合物,发现青蒿代谢途径中的重要中间产物主要由烷烃、单萜、单萜含氧衍生物、倍半萜和倍半萜含氧衍生物 5 部分组成。Wang 等[13]运用广泛靶向代谢组学对黑芝麻和白芝麻进行研究,鉴定了与黑芝麻特殊营养成分及中药作用相关的代谢物。然而,不同品质青稞的代谢物含量差异尚未被广泛研究。

近年来,随着青稞品种数目的增加,有关其营养成分的报道也逐渐增多,不同青稞品种的各种成分差异较大,研究和发掘青稞优异营养种质资源对青稞保健品的开发具有重要意义[14-15]。本研究根据青稞的品质指标,选择 3 种不同品质的青稞材料,利用广泛靶向代谢组学的方法鉴定与青稞不同品质相关的代谢物变化情况及其代谢途径,分析导致品质差异的因素,为青稞品质研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为基于品质指标(蛋白质、淀粉、β-葡聚糖、γ-氨基丁酸)含量的差异,从 81 个青稞种质资源中挑选出的 3 个青稞品种(比如青稞、曲水青稞、巴日白青稞),3 种不同品质青稞的育成年限为 2 a,育种单位为西藏自治区农牧科学院农业研究所。

1.2 试验设计

供试 81 份青稞种质材料均于 2021 年播种在西藏自治区农牧科学院农业研究所 4 号试验田,每个品种 1 个小区,小区面积为 3.6 m^2(行长 2.0 m,行距 0.3 m,共 6 行),3 个重复,试验田四周各设 2 m 保护行。待各种质达到完熟后进行采收,分别测定 81 个青稞材料的品质指标(蛋白质、淀粉、β-葡聚糖、γ-氨基丁酸含量),与西藏主推品种‘藏青 2000’比较,筛选出综合品质级别不同的 3 个材料,进行代谢组检测分析。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 品质指标测定 淀粉含量测定参考翁霞等[16]的方法并稍作改进;蛋白含量测定参考杨晓梦等[17]的方法并稍作改进;β-葡聚糖含量测定参考张如等[18]的方法并稍作改进;γ-氨基丁酸(GABA)

含量测定参考 Wang 等[19]的方法并稍作改进。

1.3.2　代谢物分析样品的提取　选取 9 个样品,按照品质高、中、低,分为 3 组进行代谢研究,每组样品为 3 个生物学重复。取真空冷冻干燥的不同品质青稞种子,利用研磨仪(MM 400,德国 Retsch)研磨(30 Hz,1.5 min)至粉末状;然后分别称取 100 mg 的粉末,在 1.0 mL 70%的甲醇提取液中进行溶解,每 30 min 涡旋一次,每次持续 30 s,共涡旋 6 次;溶解后的样品在 4℃冰箱过夜,期间进行 3 次涡旋;最后将样品以 12 000 r·min^{-1}的转速,离心 10 min,吸取上清,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤样品,并保存于进样瓶中,用于 LC-MS/MS 分析。

1.3.3　色谱质谱采集　色谱和质谱分别使用超高效液相色谱(UPLC, Shim-pack UFLC Shimadzu CBM30A,日本岛津)和串联质谱(MS/MS, Applied Biosystems 6500 QTRAP,美国)采集。

液相条件:色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18(1.8 μm,2.1 mm× 100 mm);流动相:水相为超纯水(加入 0.04%的乙酸),有机相为乙腈(加入 0.04%的乙酸);洗脱梯度:0~11 min 水/乙腈(95∶5,V/V),11.0~12.0 min 为 5∶95(V/V),12.0~12.1 min 为 95∶5(V/V),12.1~15.0 min 为 95∶5(V/V);流速 0.4 mL·min^{-1};柱温 40℃,进样量 2 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)温度 550℃,质谱电压 5 500 V(positive),-4 500 V(negative),离子源气体 I(GSI)55 psi,气体 II(GSII)60 psi,气帘气(Curtain gas, CUR)25 psi,碰撞诱导电离(Collision-activated dissociation,CAD)参数设置为高。在三重四极杆(Qtrap)中,每个离子对是根据优化的去簇电压(Declustering potential,DP)和碰撞能(Collision energy,CE)进行扫描检测。

1.3.4　代谢物定性与定量　基于自建数据库 NMDB 及 MassBank、KNAPSAcK、MoTo DB、METLIN 和其他已经存在的代谢物信息公共数据库,根据二级谱信息进行物质定性,分析时去除了同位素信号,含 K^+、Na^+、NH^{4+}离子的重复信号,以及本身是其他更大分子量物质的碎片离子的重复信号。代谢物定量是利用三重四级杆质谱的多反应监测模式(Multiple reaction monitoring, MRM)分析完成。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,对所有物质质谱峰进行峰面积积分,并对同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正。

1.4　数据分析

采用 Excel 2019 进行初步数据处理和图表绘制,利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。通过 R 软件 pheatmap 包绘制热图,对代谢物在不同样本间的积累模式进行聚类分析。使用 R 语言进行 KEGG Passway 富集分析并绘制代谢差异图。皮尔逊相关系数利用 R 软件的内置 cor 函数计算,r^2越接近 1,说明两个重复样品相关性越强。使用 SIMCA 软件进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)。

2　结果与分析

2.1　不同品质青稞品种的筛选

如表 1 所示,选出的代表性青稞中,比如青稞(KKDM2021005)的 β-葡聚糖含量(45.99 mg·g^{-1})、蛋白质含量(71.46 mg·g^{-1})和 γ-氨基丁酸含量(122.06 μg·g^{-1})均为最高;曲水青稞(ZJDM012)的淀粉含量(475.45 mg·g^{-1})、蛋白质含量(55.93 mg·g^{-1})、β-葡聚糖含量(36.98 mg·g^{-1})与巴日白青稞(DCDM2020017)的淀粉含量(522.76 mg·g^{-1})、蛋白质含量(61.73 mg·g^{-1})、β-葡聚糖含量(39.93 mg·g^{-1})差异不显著,但曲水青稞的 γ-氨基丁酸含量(107.22 μg·g^{-1})显著高于巴日白青稞(85.14 μg·g^{-1})。因此,本文选择比如青稞为品质较高的青稞,曲水青稞为品质中等的青稞,巴日白青稞为品质较差的青稞,进行广泛靶向代谢组学的研究。

2.2　正交偏最小二乘法(OPLS-DA)判别分析

正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)是一种有监督模式识别的多元统计分析方法,可以使组间区分最大化,有利于寻找差异代谢物。本研究建立了比如青稞 vs.巴日白青稞、比如青稞 vs.曲水青稞和曲水青稞 vs.巴日白青稞 3 组的 OPLS-DA 模型(图 1,见 48 页)。这 3 组模型中,每一个点可以充分代表原始数据,并且拥有良好的预测能力,能很好地解释两组样本之间的差异。由图 1 可以看出这 3 组模型均区分比较明显,表明不同品质青稞种子的代谢物含量差异明显。

2.3　重复相关性评估

皮尔逊相关系数 r 可评估不同品质青稞种子之间的相关性。由图 2(见 48 页)可知,同一品质的青稞样品平均相关系数 r 均高于 0.9,说明同一品质的青稞 3 个重复样品相关性很强。同时,组内样品的相关系数越高于组间样品的相关系数,获得的差异代谢物越可靠。各组之间的平均相关系数 r 均高于 0.5,说明后续分析获得的差异代谢物是比较可靠的。

表 1 不同品种青稞的品质指标含量

Table 1 Quality indexes of different varieties of highland barley

序号 Number	样品编号 Sample number	淀粉含量/(mg·g^{-1}) Starch content	蛋白质含量/(mg·g^{-1}) Protein content	β-葡聚糖含量/(mg·g^{-1}) β-glucan content	γ-氨基丁酸含量/(μg·g^{-1}) GABA content
1	DCDM2020001	592.31	78.82	47.30	117.65
2	DCDM2020002	599.12	84.68	43.89	107.26
3	DCDM2020003	585.08	82.02	51.02	106.49
4	DCDM2020004	565.37	75.76	39.15	95.18
5	DCDM2020005	563.39	68.11	40.53	88.29
6	DCDM2020006	548.02	70.59	44.18	95.45
7	DCDM2020007	577.00	67.52	48.24	85.57
8	DCDM2020008	567.29	80.37	52.06	90.28
9	DCDM2020009	564.30	79.00	45.57	98.58
10	DCDM2020010	583.82	70.67	43.62	94.12
11	DCDM2020011	543.80	74.82	46.49	97.90
12	DCDM2020012	555.36	81.49	43.93	96.76
13	DCDM2020013	521.06	60.97	46.24	88.44
14	DCDM2020014	539.93	67.22	45.68	107.43
15	DCDM2020015	492.71	64.18	44.41	78.53
16	DCDM2020016	543.41	77.50	44.33	85.82
17	DCDM2020017	522.76	61.73	39.93	85.14
18	DCDM2020018	523.16	73.10	36.73	96.53
19	DCDM2020019	541.77	77.57	48.40	97.50
20	DCDM2020020	583.37	70.22	38.95	115.79
21	DCDM2020021	492.65	62.57	41.96	82.35
22	DCDM2020022	536.60	70.87	40.74	87.12
23	DCDM2020023	576.53	74.32	41.32	107.99
24	ZJDM001	532.54	70.23	37.81	90.45
25	ZJDM002	532.47	63.20	43.85	121.34
26	ZJDM003	608.90	74.64	45.41	142.03
27	ZJDM004	478.95	61.37	39.69	90.11
28	ZJDM005	492.58	60.14	46.49	113.44
29	ZJDM006	463.83	59.87	32.28	107.76
30	ZJDM007	490.19	60.96	45.88	100.17
31	ZJDM008	506.89	70.96	44.26	109.70
32	ZJDM009	512.34	61.96	41.79	101.82
33	ZJDM010	483.37	64.04	44.08	111.88
34	ZJDM011	468.11	54.54	43.58	108.48
35	ZJDM012	475.45	55.93	36.98	107.22
36	ZJDM013	461.25	63.56	31.90	89.80
37	ZJDM014	490.86	57.01	39.29	114.02
38	ZJDM015	511.88	70.05	45.98	96.13
39	ZJDM016	502.98	72.45	38.13	117.91
40	ZJDM017	521.70	71.03	35.43	112.00
41	ZJDM018	490.31	67.43	37.67	95.87
42	ZJDM019	496.66	68.39	33.68	93.86
43	ZJDM020	461.26	62.19	36.43	98.28
44	ZJDM021	488.61	70.50	38.38	111.95
45	ZJDM022	545.57	72.80	37.80	124.24
46	ZJDM023	526.89	69.72	47.33	114.56
47	ZJDM024	508.35	69.88	36.24	118.92
48	ZJDM025	499.65	68.26	39.36	103.60
49	ZJDM026	558.63	68.74	40.94	106.96
50	ZJDM027	561.86	69.65	40.75	113.38
51	ZJDM028	542.79	66.17	41.35	122.73
52	ZJDM029	513.03	61.01	41.39	118.79
53	ZJDM030	507.89	71.88	35.37	124.05
54	ZJDM031	535.41	73.70	45.37	122.69

续表 1　不同品种青稞的品质指标含量

Continued table 1　Quality indexes of different varieties of highland barley

序号 Number	样品编号 Sample number	淀粉含量/(mg·g^{-1}) Starch content	蛋白质含量/(mg·g^{-1}) Protein content	β-葡聚糖含量/(mg·g^{-1}) β-glucan content	γ-氨基丁酸含量/(μg·g^{-1}) GABA content
55	ZJDM032	494.34	68.54	39.01	92.77
56	KKDM2021001	491.03	68.22	44.15	110.71
57	KKDM2021002	547.33	66.16	45.08	110.18
58	KKDM2021003	524.25	67.17	47.56	103.59
59	KKDM2021004	523.18	62.78	41.68	98.20
60	KKDM2021005	519.00	71.46	45.99	122.06
61	KKDM2021006	601.08	85.17	52.33	101.28
62	KKDM2021007	523.62	62.12	54.29	111.45
63	KKDM2021008	538.03	67.01	46.81	113.44
64	KKDM2021009	494.46	62.57	49.01	117.43
65	PCDM2020001	508.49	65.53	53.68	113.21
66	PCDM2020002	515.29	66.94	50.11	89.04
67	PCDM2020003	562.07	78.15	53.81	89.11
68	PCDM2020004	491.32	61.92	53.66	93.77
69	PCDM2020005	530.86	66.33	45.58	111.34
70	PCDM2020006	531.70	62.46	45.80	131.46
71	PCDM2020007	551.73	74.35	54.79	96.05
72	PCDM2020008	505.19	68.58	47.85	127.10
73	PCDM2020009	429.45	61.21	47.45	112.83
74	PCDM2020010	487.82	64.79	46.75	100.18
75	PCDM2020011	515.94	65.85	54.96	105.04
76	PCDM2020012	488.67	68.25	44.43	108.37
77	PCDM2020013	479.57	70.24	43.39	107.95
78	PCDM2020014	482.00	65.60	44.82	108.61
79	KKDM2020001	481.65	66.31	52.48	109.20
80	KKDM2020002	496.10	60.96	45.88	106.25
81	CK	532.66	64.93	51.19	121.90

注:DCDM 代表来自林芝巴日乡拉麦村的青稞(巴日白青稞),KKDM 代表来自那曲比如县白嘎乡沃阔村的青稞(比如青稞),ZJDM 代表来自拉萨曲水县的青稞(曲水青稞);PCDM 代表山南青稞;CK 为西藏主推品种'藏青 2000'。

Note: DCDM represents the highland barley from Lamai Village, Bari Township, Nyingchi ('Baribai' highland barley), KKDM represents the highland barley from Wokuo Village, Baiga Township, Nagqu Bilu County ('Biru' highland barley), ZJDM represents the highland barley from Qushui County, Lhasa ('Qushui' highland barley).PCDM represents Shannan highland barley, CK is 'Zangqing 2000'.

2.4　差异代谢物火山图

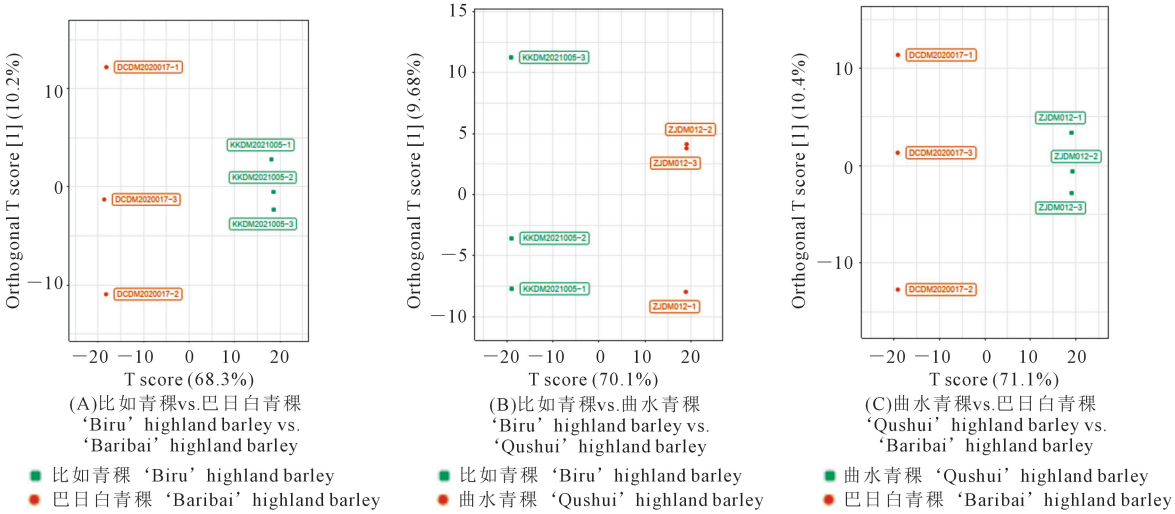
火山图(Volcano plot)可清晰展现各比较组差异代谢物数目及变化情况,以快速查看代谢物在两个样品中表达水平的差异。由图 3 可知,比如青稞 vs.巴日白青稞筛选到的差异代谢物有 262 种,比如青稞 vs.曲水青稞和曲水青稞 vs.巴日白青稞分别筛选到 261 和 298 种。

2.5　差异代谢物聚类分析

对 3 种不同品质青稞的代谢物进行聚类分析,可观察代谢物在不同品质青稞种子内的变化情况。由图 4 可直观看出 821 个代谢物在各组中每个样本的含量分布,比如青稞 vs.巴日白青稞(56 个上调,206 个下调),比如青稞 vs.曲水青稞(179 个上调,82 个下调),曲水青稞 vs.巴日白青稞(58 个上调,240 个下调)差异表达显著的代谢物总数分别为 262、261、298。其中品质中等的曲水青稞和品质较差的巴日白青稞差异表达显著的代谢物总数最多,表明不同品质青稞的代谢物含量有所不同。

2.6　差异倍数(Fold change)分析

各分组差异倍数变化前 20 的代谢物如图 5(见 50 页)所示,和巴日白青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是酚酸类物质,上调倍数最大的是顺丁烯二酰基-咖啡酰奎宁酸;下调的代谢物主要是黄酮类物质,下调倍数最大的是麦黄酮 7-O-葡萄糖醛酸苷。和曲水青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是花青素类物质,上调倍数最大的是天竺葵素-3-O-(3",6"-二丙二酰葡萄糖苷),矢车菊素-O-丁香酸和矢车菊素-3-O-(3"",6""-二乙酰葡萄糖苷)-O-甘油酸的上调也非常突出;下调的代谢物主要是黄酮碳糖苷类物质,下调倍数最大的是橙皮素 C-己糖苷。和巴日白青稞相比,曲水青稞上调的代谢物主要是黄酮碳糖苷类物质,上调倍数最大的是橙皮素 C-己糖苷;下调的代谢物主要是花青素类物质,下调倍数最大的是矢车菊素-3-O-半乳糖苷,矢车菊素 O-乙酰基己糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和矮牵牛素-O-戊糖的下调也非常突出。

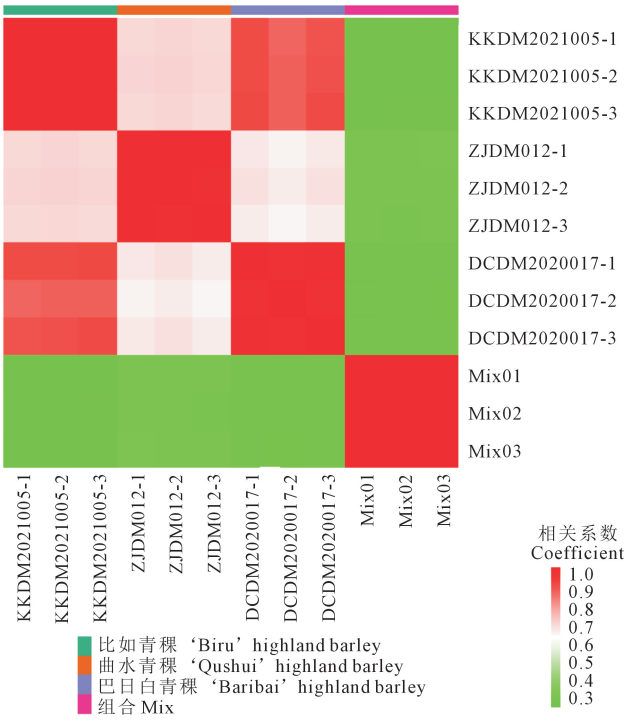


注:横坐标表示预测主成分,横坐标方向可以看出组间的差距;纵坐标表示正交主成分,纵坐标方向可以看出组内的差距;百分比表示该成分对数据集的解释度。图中的每个点表示一个样品,同组的样品使用同一种颜色表示,样品后数字表示同一样品的 3 个重复,下同。

Note: The abscissa represents the principal component of the prediction, and the ordinate shows the difference between the groups. The ordinate represents the orthogonal principal component, and the ordinate direction can show the difference within the group. Percentages represent how well the component explains the data set. Each point in the figure represents a sample, samples from the same group are represented by the same color, and the number after the sample represents three replicates of the same sample, the same below.

图 1 不同品质青稞的 OPLS-DA 得分图

Fig.1 The OPLS-DA score plots of highland barley with different qualities



注:绿色代表下调差异表达代谢物,红色代表上调差异表达代谢物。

Note: The green color represents down-regulated differentially expressed metabolites and the red color represents up-regulated differentially expressed metabolites.

图 2 不同品质青稞样品间相关性图

Fig.2 Repetitive correlation between samples of highland barley with different qualities

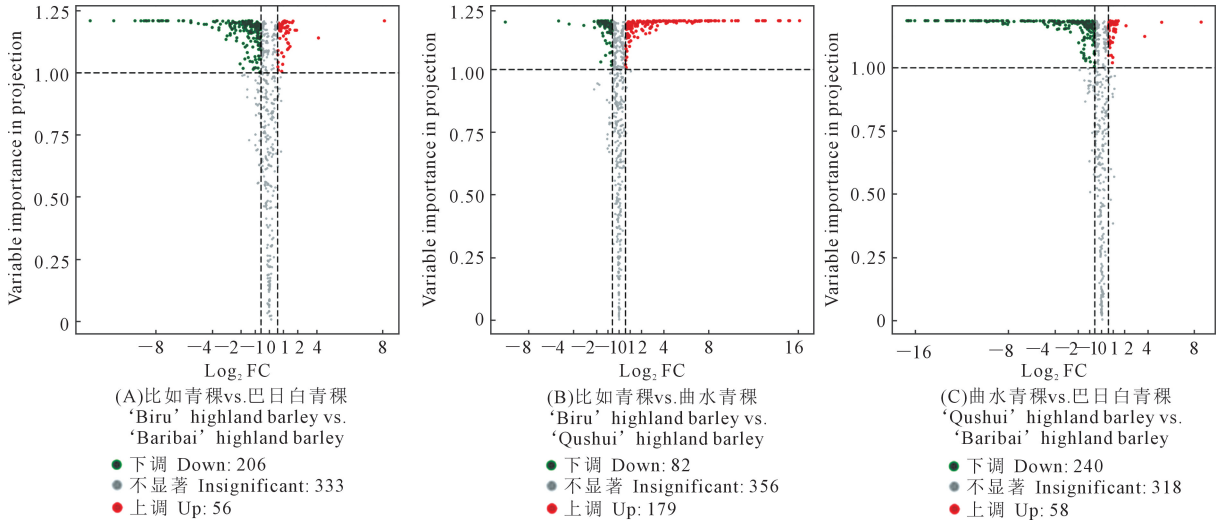
2.7 代谢通路分析

对差异代谢物进行通路富集分析有助于了解其在代谢途径的变化机制,利用 KEGG 数据库对检测到的差异代谢物进行注释并进行通路富集分析。如图 6(见 51 页)所示,各分组比较中,比如青稞 vs.巴日白青稞、比如青稞 vs.曲水青稞和曲水青稞 vs.巴日白青稞的差异代谢物中分别有 262、261 和 298 个代谢物被注释到相应代谢通路中。和巴日白青稞相比,比如青稞的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成和类黄酮生物合成等通路富集显著。和曲水青稞相比,比如青稞上调的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成和 2-氧代环戊烷羧酸甲酯代谢等通路显著富集。和巴日白青稞相比,曲水青稞的差异代谢物共富集在 61 条代谢通路上,主要是黄酮和黄酮醇的生物合成、嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨酰生物合成。

3 讨 论

青稞是一种具有营养保健功能的特色粮食作物,符合当前人们营养和健康的需求。我国青稞资源遗传多样性丰富,西藏主要农区的青稞品种存在一定的遗传多样性,是研究重要性状遗传、基因挖掘和品质育种的宝贵资源库。本文通过测定不同品种青稞 β-葡聚糖、GABA、蛋白质和淀粉含量,选择各

营养物质含量相对较高的比如青稞作为品质较好的青稞,营养物质含量中等的曲水青稞作为品质中等的青稞,营养物质含量相对较低的巴日白青稞作为品质较差的青稞。代谢组学研究分析结果,和巴日白青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是酚酸类物质;和曲水青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是花青素类物质;和巴日白青稞相比,曲水青稞上调的代谢物主要是黄酮碳糖苷类物质。

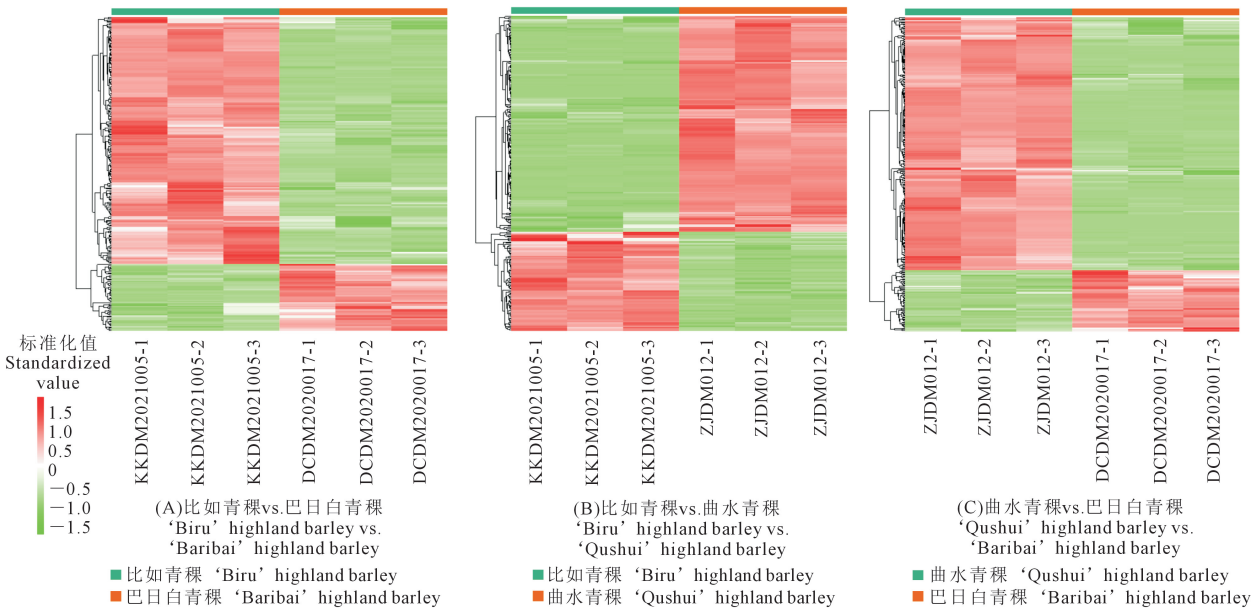


注:一个点表示一种代谢物;横坐标表示某代谢物在两样品中定量差异倍数的对数值;纵坐标表示 VIP 值。绿色的点代表下调差异表达代谢物,红色的点代表上调差异表达代谢物,灰色代表检测到但差异不显著的代谢物。

Note: One dot represents a metabolite. The abscissa represents the logarithmic value of the quantitative difference multiple of a certain metabolite in two samples, the vertical axis represents the VIP value. The green dots represent down-regulated differentially expressed metabolites and the red dots represent up-regulated differentially expressed metabolites.

图 3　差异代谢物火山图

Fig.3　Volcano plot of differential metabolites

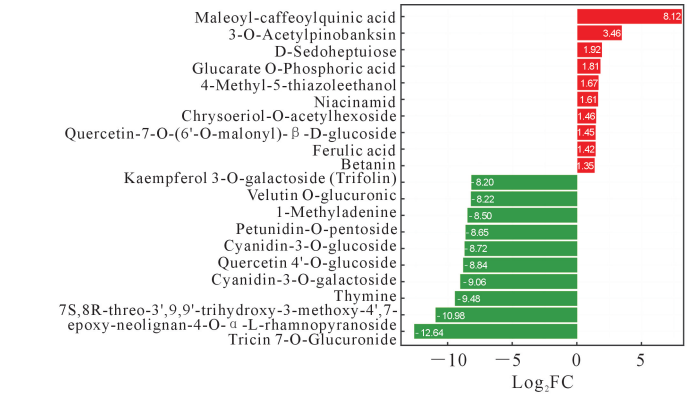


注:横向为样品名称,纵向为差异代谢物信息,不同颜色为相对含量标准化处理后得到的代谢物含量值(红色代表高含量,绿色代表低含量)。

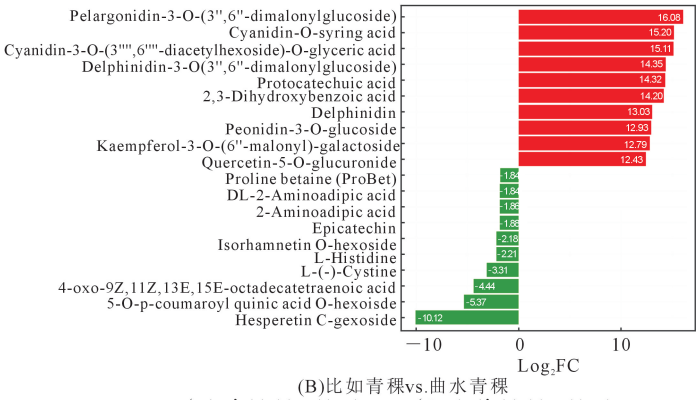
Note: The horizontal axis represents different sample names, the vertical axis represents differential metabolites. Different colors represent the values obtained after relative content standardization (red represents high content, green represents low content).

图 4　不同品质青稞差异代谢物聚类热图

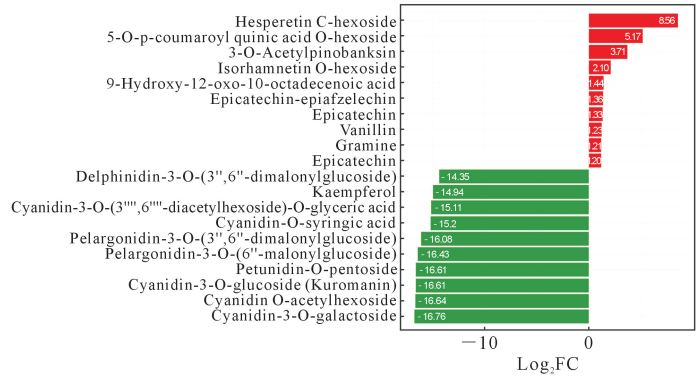
Fig.4　Heatmap of differentially significant metabolites between samples of highland barley with different qualities



(A)比如青稞vs.巴日白青稞
'Biru' highland barley vs. 'Baribai' highland barley



(B)比如青稞vs.曲水青稞
'Biru' highland barley vs. 'Qushui' highland barley



(C)曲水青稞vs.巴日白青稞
'Qushui' highland barley vs. 'Baribai' highland barley

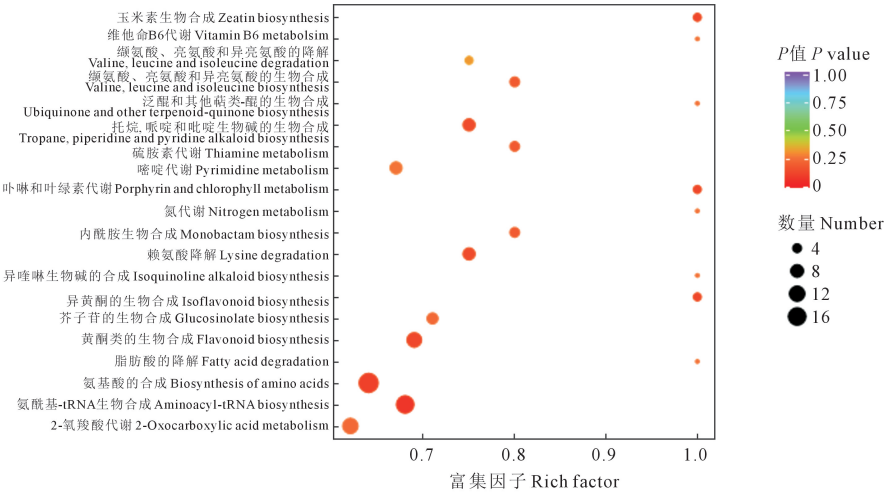
注:横坐标为差异代谢物的 $\log_2$FC,即差异代谢物的差异倍数以 2 为底取对数的值,柱上数字即 $\log_2$FC 值;纵坐标为差异代谢物。红色代表上调差异表达代谢物,绿色代表下调差异表达代谢物。

Note: The abscissa represents the $\log_2$FC of differential metabolites, which is the logarithmic value of the difference multiple of differential metabolites with a base of 2, the numbers in the bar represent $\log_2$FC value. The vertical axis represents differential metabolites. Red color represents up-regulated metabolites and green color represents down-regulated metabolites.

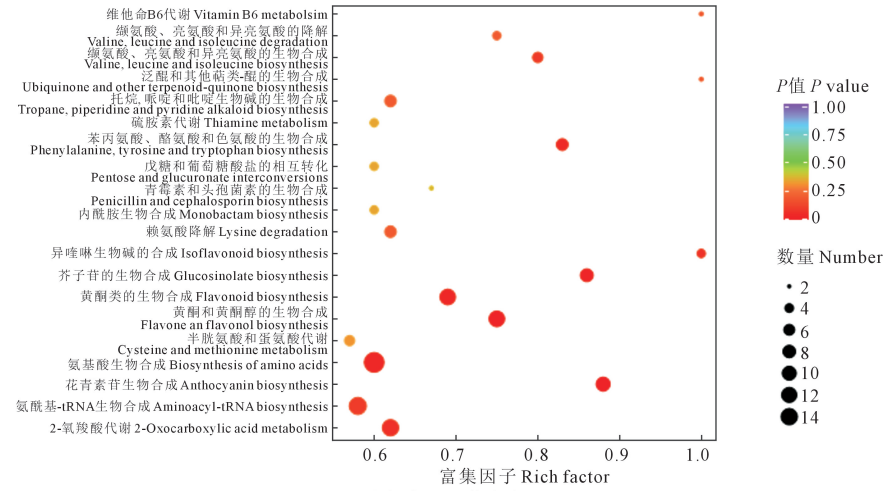
图 5 差异倍数变化前 20 的代谢物柱状图

Fig.5 The metabolite histogram of the first 20 compounds of the fold change

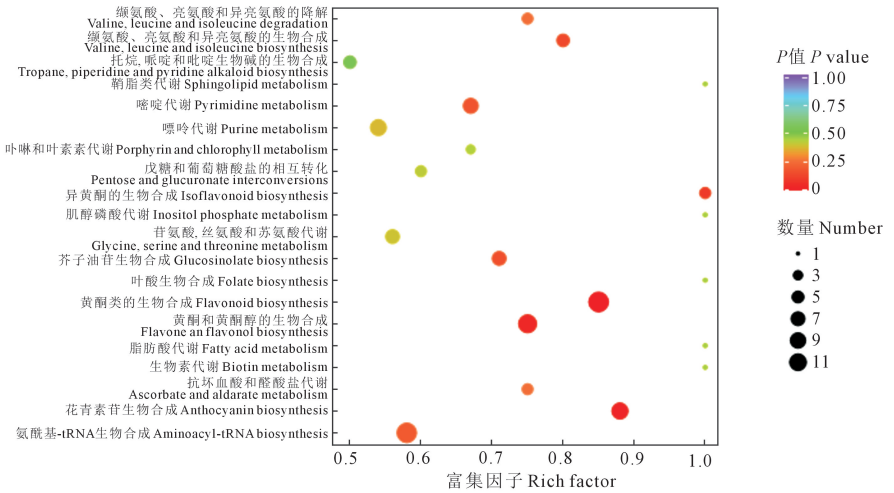
青稞主营养成分具有"三高两低"(高蛋白、高纤维、高维生素,低脂肪、低糖)的特点,富含 β-葡聚糖、黄酮、生育酚、维生素、膳食纤维、γ-氨基丁酸等多种具有降脂、抗癌功效的功能性成份[20]。此外,有色青稞含有的花青素是有效的抗氧化剂和自由基清除剂,其抗氧化性能比 Ve 高 50 倍、比 Vc 高 20 倍,且具有改善视力和预防神经衰退等功能[21]。和品质较差的青稞相比,品质较好青稞上调的代谢物主要是酚类物质。近 10 年来,青稞因其高含量的 β-葡聚糖以及突出的降血脂、抗糖尿病和抗动脉粥样硬化作用而受到广泛关注。然而,关于青稞中酚类化合物的研究报道较少。酚类化合物是最重要的抗氧化化合物之一,广泛分布在水果和蔬菜以及全谷物中[22-23]。近年来的研究表明,谷物中的酚类



(A)比如青稞vs.巴日白青稞
'Biru' highland barley vs. 'Baribai' highland barley



(B)比如青稞vs.曲水青稞
'Biru' highland barley vs. 'Qushui' highland barley



(C)曲水青稞vs.巴日白青稞
'Qushui' highland barley vs. 'Baribai' highland barley

注:横坐标表示每个通路对应的富集因子值,纵坐标为通路名称。点的颜色为 P-value,越红表示富集越显著;点的大小代表富集到的差异代谢物的个数。

Note: The abscissa represents the rich factor corresponding to each pathway; the ordinate represents the pathway name. The color of the points is P-value, the red indicates the more significant enrichment. The size of the dots represents the number of differentiated metabolites enriched.

图 6　差异代谢物 KEGG 富集气泡图

Fig.6　Bubble map of KEGG enrichment of differential metabolites

化合物具有良好的抗氧化、抗肿瘤、降血脂和降血糖的作用。此外,酚类化合物对青稞的抗胁迫[24]、抗病害和生长发育有强大的调节作用[25]。众所周知,青藏高原地区具有极寒、缺氧、强紫外线辐射的特点,而青稞正是这种极端环境下的独特作物[26]。因此,研究青藏高原地区不同品质青稞的酚类化合物和抗氧化活性有助于揭示不同品质青稞的营养价值,指导青稞的健康消费。此外,本研究中,和品质中等的青稞相比,品质较好的青稞上调的代谢物主要是花青素类物质。前人研究表明,青稞籽粒品质属于数量性状,不仅受基因型控制,同时还受生态环境影响[27]。目前有关海拔高度等因子对花青素的影响研究较少,郑顺林等[28]研究表明,在 800~2 500 m 海拔范围内,随着海拔升高,云南紫色马铃薯薯皮、薯肉的花青素含量均有所增加。花青素主要存在于青稞籽粒的果皮或糊粉层中,使籽粒颜色呈紫色或蓝色[29]。花青素是一种多酚类色素,属于类黄酮类,是水果、花和叶子等植物器官中红橙色到蓝紫色的主要色素[30]。研究表明,花青素具有抗糖尿病、抗癌、抗动脉粥样硬化和抗肿瘤特性[31-32];且花青素比糖基能更有效地对抗心血管疾病[33]。还有研究表明,低温可以诱导植物体内花色素苷的合成,光照是影响花青素合成的主要因子,光照越强,花青素积累越多[34]。基于此,本研究推测上调差异显著的花青素可能是导致青稞品质不同的原因之一。因此,以多酚及花青素含量为重点进行青稞功能产品开发,对促进青稞综合利用、提升青稞附加值具有重要作用。

在功能富集分析中,本研究发现,和品质较差的青稞相比,品质较好青稞的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成、类黄酮生物合成等通路富集显著。和曲水青稞相比,比如青稞上调的差异代谢物共富集在 65 条代谢通路上,主要是氨基酸的生物合成、氨酰生物合成、2-氧代环戊烷羧酸甲酯代谢等通路显著富集。和品巴日白青稞相比,曲水青稞的差异代谢物共富集在 61 条代谢通路上,主要是黄酮和黄酮醇的生物合成、嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨酰生物合成。前人研究表明,青稞含有 8 种人体必需氨基酸,且不同于大多数谷物缺乏赖氨酸的状况,赖氨酸在青稞中的含量高达 0.36 g · 100 g^{-1},这对于人体营养的补充意义重大[35]。黄酮类化合物因其特殊的化学结构而具有较强的抗氧化作用以及抗癌、抗菌、抗炎症和降血糖等功效,在医药和食品领域都具有良好的应用价值[36]。青稞中的黄酮类化合物具有抗氧化、诱导肿瘤细胞凋亡、阻滞细胞分裂周期等作用,其在抗肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、白血病和肝癌等方面的作用均得到了证实[37]。可见,不同差异代谢物富集在代谢通路中可能形成不同品质的青稞,可为不同品质青稞作用的发挥提供参照。

除 β-葡聚糖外,青稞中众多有效成分未被检测及开发利用,此次检测到的多种代谢物与青稞品质的关系是未来青稞开发利用的重要研究方向。代谢组学信息可为青稞中众多有效成分的分离纯化鉴定、活性成分的研究提供依据,相关代谢途径也为后续研究关键代谢物、代谢途径上关键基因的功能及其主要代谢产物的生物合成提供参考。

4 结 论

通过测定 81 个不同品种青稞 β-葡聚糖、GABA、蛋白质和淀粉含量,选择营养物质含量相对较高的比如青稞作为品质较好的青稞,营养物质含量中等的曲水青稞作为品质中等的青稞,营养物质含量相对较低的巴日白青稞作为品质较差的青稞。聚类分析、样本相关性分析和正交偏最小二乘判别分析表明曲水青稞与巴日白青稞,曲水青稞与比如青稞的组间差异比较大。差异倍数分析表明,和巴日白青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是酚酸类物质;和曲水青稞相比,比如青稞上调的代谢物主要是花青素类物质;和巴日白青稞相比,曲水青稞上调的代谢物主要是黄酮碳糖苷类物质。代谢通路富集分析结果表明,比如青稞 vs.巴日白青稞、比如青稞 vs.曲水青稞和曲水青稞 vs.巴日白青稞的差异代谢物中分别有 262、261 和 298 个代谢物被注释到相应代谢通路中。

参 考 文 献:

[1] HE T, JIA J F. High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hk. f.) under endosperm-supported culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 95(2): 251-254.

[2] BAIK B K, ULLRICH S E. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest[J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48(2): 233-242.

[3] LI Y L, LONG C L, KATO K, et al. Indigenous knowledge and traditional conservation of hulless barley (*Hordeum vulgare*) germplasm resources in the Tibetan communities of Shangri-la, Yunnan, SW China [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2011, 58(5): 645-655.

[4] OBADI M, SUN J, XU B. Highland barley: chemical composition, bioactive compounds, health effects, and applications[J]. Food Research International, 2021, 140: 110065.

[5] 朱睦元, 张京. 大麦 (青稞) 营养分析及其食品加工[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2015: 56-57.

ZHU M Y, ZHANG J. Nutrition analysis and food process of barley [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2015: 56-57.

[6] 汪丽萍, 谭斌, 刘明, 等. 全谷物中生理活性物质的研究进展与展望[J]. 中国食品学报, 2012, 12(8): 141-147.
WANG L P, TAN B, LIU M, et al. Research progress and prospect of bioactive components in whole grain[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(8): 141-147.

[7] 王鹏珍, 牛忠海, 张世满, 等. 青稞原料营养成分浅析[J]. 酿酒科技, 1997,(3): 30-31.
WANG P Z, NIU Z H, ZHANG S M, et al. Analysis on the nutritional components of highland barley[J]. Liquor-Making Science & Technology, 1997,(3): 30-31.

[8] 臧靖巍, 阚建全, 陈宗道, 等. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. 中国食品添加剂, 2004,(4): 43-46.
ZANG J W, KAN J Q, CHEN Z D, et al. Applications of barley and study on its components[J]. China Food Additives, 2004,(4): 43-46.

[9] LINDON J C, NICHOLSON J K. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008, 1: 45-69.

[10] YANG M, YANG J, SU L, et al. Metabolic profile analysis and identification of key metabolites during rice seed germination under low-temperature stress[J]. Plant Science, 2019, 289: 110282.

[11] MA C F, WANG H H, LU X, et al. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1150(1/2): 50-53.

[12] 许国旺, 路鑫, 杨胜利. 代谢组学研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711.
XU G W,LU X, YANG S L. Recent advances in metabonomics[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2007, 29(6): 701-711.

[13] WANG D D, ZHANG L X, HUANG X R, et al. Identification of nutritional components in black sesame determined by widely targeted metabolomics and traditional Chinese medicines [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1180.

[14] 党君. 西北不同地区不同品种青稞营养成分的分析研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017,(1): 157-159.
DANG J. Analysis of nutritional composition of different varieties of highland barley in different areas of northwest China[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017,(1): 157-159.

[15] 董吉林, 李鹏冲, 申瑞玲, 等. 青稞萌发工艺优化及营养成分分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 158-161.
DONG J L, LI P C, SHEN R L, et al. Optimization of germination process and analysis of nutritional components in hull-less barley[J]. Food & Machinery, 2017, 33(2): 158-161.

[16] 翁霞, 辛广, 李云霞. 蒽酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(17): 86-88.
WENG X, XIN G, LI Y X. Study on determination conditions of total sugar from potato starch by anthrone colorimetry[J]. Food Research and Development, 2013, 34(17): 86-88.

[17] 杨晓梦, 杜娟, 曾亚文, 等. 大麦籽粒蛋白质及其相关功能成分含量的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 205-215.
YANG X M, DU J, ZENG Y W, et al. QTL mapping of protein and related functional components content in barley grains[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(2): 205-215.

[18] 张如, 戴巧玲, 吴小燕, 等. 分光光度法测定燕麦 β-葡聚糖含量[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(6): 140-145.
ZHANG R, DAI Q L, WU X Y, et al. Quantification of oat β-glucan by spectrophotometry[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(6): 140-145.

[19] WANG Y S, LIU M Y, ZHAO L M, et al. Influence of processing conditions on reducing γ-aminobutyric acid content during fortified milk production[J]. Food Research International, 2015, 72: 215-222.

[20] REINHARDT D, JANSEN G, SEDDIGS, et al. Temperature stress during flowering time affects yield and quality parameters of waxy barley[J]. Landbauforschung, 2013, 63(1): 79-84.

[21] 唐忠厚, 周丽. 花青素对人类健康影响的研究进展及其前景[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 159-162.
TANG Z H, ZHOU L. Study on anthocyanins influencing on human health and its prospect[J]. Food Research And Development, 2009, 30(7): 159-162.

[22] LIU R H. Whole grain phytochemicals and health[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(3): 207-219.

[23] HAMINIUK C W I, MACIEL G M, PLATA-OVIEDO M S V, et al. Phenolic compounds in fruits-an overview[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(10): 2023-2044.

[24] 胡书银, 王建林, 钟国辉, 等. 酚类化合物的保护作用与裸大麦的抗寒性[J]. 大麦科学, 1999,(1): 17-20.
HU S Y, WANG J L, ZHONG G H, et al. Protective effects of phenolic compounds and cold resistance of naked barley[J]. Barley Science, 1999,(1): 17-20.

[25] 孔维宝, 陆健, 孙军勇, 等. 大麦酚类化合物及相关酶类的研究进展[J]. 啤酒科技, 2008,(6): 39-43, 46.
KONG W B, LU J, SUN J Y, et al. Advances in phenolic compounds and related enzymes of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed[J]. Beer Science and Technology, 2008,(6): 39-43, 46.

[26] YANG X J, DANG B, FAN M T. Free and bound phenolic compound content and antioxidant activity of different cultivated blue highland barley varieties from the Qinghai-Tibet plateau[J]. Molecules, 2018, 23(4): 879.

[27] 栾运芳, 赵慧芬, 何燕. 基因型与环境效应对西藏春青稞 β-葡聚糖和食用纤维含量的影响[J]. 大麦与谷类科学, 2009,(3): 1-5.
LUAN Y F, ZHAO H F, HE Y.Effects on content of β-glucans and dietary fiber from Tibet spring highland barley[J]. Barley and Cereal Sciences, 2009,(3): 1-5.

[28] 郑顺林, 张仪, 李世林, 等. 不同海拔高度对紫色马铃薯产量、品质及花青素含量的影响[J]. 西南农业学报, 2013, 26(4): 1420-1423.
ZHENG S L, ZHANG Y, LI S L, et al. Effects of different altitudes on yield, quality and anthocyanin content of purple potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(4): 1420-1423.

[29] SURIANO S, SAVINO M, CODIANNI P, et al. Anthocyanin profile and antioxidant capacity in coloured barley[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 54(7): 2478-2486.

(下转第 107 页)