

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2015.01.09

拟南芥花粉管与柱头互作的乙醇代谢耦合模型

陶璐, 岳训*

(山东农业大学信息科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

摘要:依据拟南芥公开的代谢途径数据库,构建了基于酶与酶的拟南芥代谢网络模型。利用拟南芥花粉管与柱头互作过程中的转录组数据,挖掘出花粉管与柱头在互作过程中的特异表达基因,进一步将特异表达的酶基因匹配到已构建的拟南芥代谢网络中,根据网络拓扑模型中的节点(酶)之间的共表达关联性,最后给出了一个拟南芥花粉管与柱头互作的乙醇代谢耦合模型。

关键词:拟南芥;授粉;代谢网络

中图分类号:Q942 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2015)-01-047-07

Ethanol metabolism coupling model between *Arabidopsis* pollen tube and stigma

TAO Lu, YUE Xun*

(College of Information Sciences and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian Shandong 271018, China)

Abstract: According to the public database of *Arabidopsis* metabolism pathway, this paper constructed a metabolism correlation networks model based on enzymes correlation. Transcriptional expression data of the interaction between *Arabidopsis* pollen tube and stigma were used to mine significant differentially expressed genes. The significant differentially expressed genes that encoded enzymes were mapped to the enzyme correlation networks model. According to the co-regulation and inter-regulation model of the co-expressed enzymes in the consecutive steps for metabolic routes, we proposed an ethanol metabolism coupling model between *Arabidopsis* pollen tube and stigma.

Keywords: *Arabidopsis*; Pollination; Enzyme correlation networks model

传粉与受精是植物产生种子的基础,也是植物进行有性生殖的关键所在。植物雌雄配子体互作是植物生殖与发育生物学研究领域重要和热点问题之一^[1]。传粉与受精的效率和质量直接关系到作物产量的高低。系统地阐明植物花粉管与柱头互作的机制,对提高作物产量具有重要意义^[2]。

花粉管在雌蕊组织内的导向性生长是雌雄配子体相互作用的重要阶段之一^[3]。与植物其他器官不同,花粉管以极性而非扩散性方式生长。花粉管可以在体外简单培养基中生长^[4],而当其在雌蕊体内生长时,雌蕊提供其快速生长所需的物质。在过去的20多年中,为了探究植物花粉管与柱头在授粉过程中的调控机理,科学家们对此进行了大量的研究^[5-6]。但是,授粉过程中雌雄配子体互作的分子调控机制细节仍然不是很清楚^[7]。

随着拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等植物基因组全序列测定的完成,在后基因组学与蛋白质组学时代,转录组、蛋白组等组学技术的应用和从计算系统生物学水平上系统深入开展雌雄配子体互作调控网络的研究,已成为植物生殖与发育生物学研究领域的重要发展趋势。

本文从计算系统生物学水平上对拟南芥花粉管在柱头引导组织中导向生长过程中的互作机制进行探究,依据拟南芥公开的代谢途径数据库,构建了基于酶与酶的拟南芥代谢网络模型。然后利用拟南芥花粉管和柱头互作过程中的转录表达数据,挖掘互作过程中的特异表达的基因,进一步将特异表达基因编码的酶匹配到已构建的代谢互作网络中,根据网络拓扑结构中的节点关联性,发现柱头组织可以通过产生的乙醇参与到花粉管TCA循环中,间接为

收稿日期:2014-09-29;修回日期:2014-11-18.

基金项目:作物生物学国家重点实验室开放课题(NO.2013KF15)。

作者简介:陶璐,男,硕士研究生,研究方向:生物信息学,数据挖掘;E-mail:taolu025@163.com.

*通信作者:岳训,男,副教授,硕士生导师,研究方向:计算系统生物学,生物信息学,数据挖掘;E-mail:yuexun@sdau.edu.cn.

花粉管在柱头组织中的快速生长提供能量和营养物质。最后给出了一个拟南芥花粉管与柱头互作的乙醇代谢耦合模型。

1 材料、数据及方法

1.1 拟南芥柱头数据

Boavida 利用拟南芥 ATH1 的全基因组阵列, 比较了野生型未授粉柱头与授粉后 0.5H, 3.5H 和 8H 柱头的表达谱, 得到了拟南芥 Affymetrix ATH1 寡核苷酸微阵列芯片数据^[8]。本文以这组芯片数据为基础, 通过数据分析等方法对拟南芥花粉管与柱头的互动机制进行分析 (NCBI 基因综合数据库编号: GSE27281)。

1.2 拟南芥花粉管数据

采用 Qin et al. 研究获得的包括干花粉粒、未萌发花粉、离体培养 0.5H 和 4H 的花粉、萌发的花粉和在柱头中生长的花粉管等的芯片数据^[9] (NCBI 基因综合数据库编号: GSE17343)。

1.3 拟南芥代谢网络的构建

构建拟南芥代谢网络需按照以下七步进行:

(1) 从拟南芥代谢途径数据库 (<http://www.Arabidopsis.org/biocyc/>) 中下载源数据文件 (TXT 格式)。文件中包含有 540 个代谢途径, 7 127 个酶, 3 418 个生化反应, 3 323 个化合物等内容。

(2) 源数据文件中的内容并不是都对构建代谢网络有效, 所有先将拟南芥代谢途径数据文件 (包括代谢途径、反应酶、相关基因、反应式和各种化合物) 导入 Oracle 数据库, 做数据预处理。

(3) 代谢网络模型构建规则的确定。如图 1 所示, 如果在酶 1 的催化下反应生成了底物 A 和 B, 底物 A 或者底物 B 又经过酶 2 的催化反应生成了底物 C, 那么酶 1 和酶 2 就建立起了关联。代谢物反应式是确定酶与酶是否存在联系的依据。在代谢网络模型中, 网络拓扑中的一个节点就代表一个酶, 一条边代表两个节点 (酶) 之间存在关联。

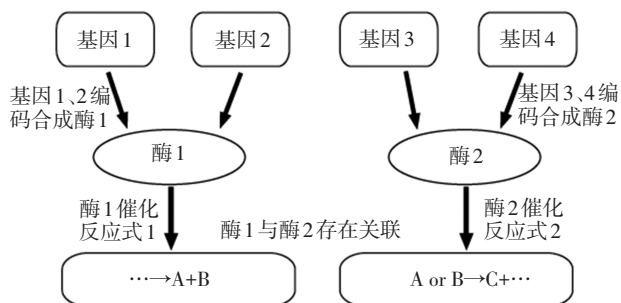


图 1 代谢网络模型构建规则

Fig.1 The rules of constructing the metabolic network model

(4) 在确定了代谢网络构建规则的基础上, 利用 Oracle 数据库和 SQL (结构化查询语言) 对源文件处理。首先从源数据文件中提取出存在的反应关系式以及相对应催化反应关系式的酶。然后利用 SQL 语句, 将反应关系式中的反应物与催化该反应的酶进行一一对应, 同时将反应关系式中的生成物与催化该反应的酶进行一一对应。

(5) 剔除上述两组数据中含有小分子 (H^+ , NADH, NADP, NADPH, NH_3 , ATP, ADP, AMP, NAD, CoA, O_2 , CO_2 , Glu 和 pyrophosphate) 的反应物或生成物记录。由于这些小分子通常是作为细胞电子转移的媒介, 与代谢过程作用不大。如不剔除, 会增加所构建网络的负担, 对进一步的网络拓扑分析造成一定的干扰。

(6) 利用 Oracle 数据库平台和 SQL 语句, 在代谢网络构建规则的基础上构建酶与酶一一对应的关系。完成构建网络前的必需数据预处理准备。

(7) 将上一步中已经处理准备好的酶与酶一一对应的数据导入生物分子网络分析软件 Cytoscape。最后, 拟南芥代谢网络模型在 Cytoscape 平台上直观呈现出来^[10]。如图 2(a) 所示。

1.4 基因本体分析

基因本体 (Gene ontology, GO) 是一个在生物信息学领域中广泛使用的本体。它主要包括三个分支: 细胞组件、分子功能和生物过程^[11]。本文使用的生物网络基因本体分析工具是软件 Cytoscape 中的一个插件 (BiNGO 2.3)^[12], 用来识别过表达基因的 P 值在 5×10^{-5} 水平上的功能团。

1.5 差异基因

那些在至少一个生物学过程中特异表达, 并且野生型和实验体差异倍数大于等于 2, 错误反现率小于等于 1×10^{-10} 的基因, 被认为是差异基因。利用差异基因进行 GO 分析, 可以大致确定差异基因的生物功能。

1.6 拟南芥花粉管和柱头的差异基因编码酶的子网络的构建

从拟南芥代谢途径数据库 (<http://www.arabidopsis.org/biocyc/>) 中下载代谢途径 (pathway) 的源数据文件。文件中包含有酶编号和基因编号等内容。将文件导入到 Oracle 数据库中, 利用 SQL 语句找到拟南芥花粉管和柱头中差异基因编码的酶。在拟南芥代谢网络模型中将拟南芥花粉管和柱头在授粉过程中特异表达基因编码的酶表示出来。如图 2(b, c), 分别是拟南芥花粉管和柱头在授粉过程中特意表达的基因编码酶在已构建的拟南芥代谢网络中的标记, 图 2(d, e) 分别是拟南芥花粉管和

柱头在授粉过程中特意表达的基因编码的酶所构成的子网络模型。

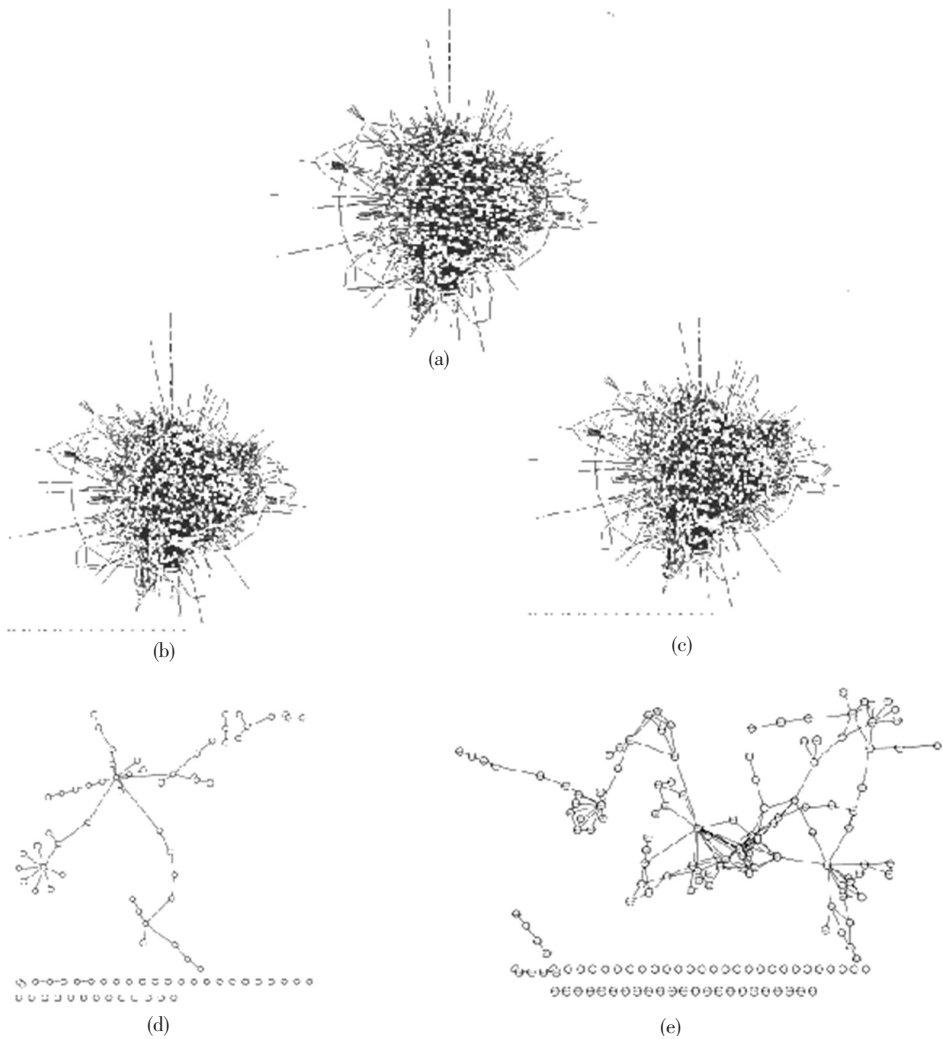


图 2 拟南芥花粉管和柱头代谢网络拓扑

Fig.2 The metabolic network models of Arabidopsis, pollen tube and stigma

注:(a) 拟南芥代谢网络模型;(b) 突出显示的是拟南芥花粉管在授粉过程中特意表达的基因所编码的酶在已构建的拟南芥代谢网络中的标记;(c) 突出显示的是拟南芥柱头在授粉过程中特意表达的基因所编码的酶在已构建的拟南芥代谢网络中的标记;(d) 拟南芥花粉管在授粉过程中特意表达的基因所编码的酶所构成的子网络模型;(e) 拟南芥柱头在授粉过程中特意表达的基因所编码的酶所构成的子网络模型。

Notes:(a) The metabolic network model of Arabidopsis; (b) The enzymes encoded by differentially expressed genes in pollen tube during the process of pollination were highlighted in the metabolic network model of Arabidopsis; (c) The enzymes encoded by differentially expressed genes in stigma during the process of pollination were highlighted in the metabolic network model of Arabidopsis; (d) The sub-network constructed by the enzymes which encoded by differentially expressed genes in pollen tube; (e) The sub-network constructed by the enzymes which encoded by differentially expressed genes in stigma.

2 结果与分析

2.1 拟南芥花粉管和柱头的差异基因

在拟南芥花粉管中找到 1 121 个差异基因,在拟南芥柱头中找到了 1 468 个差异基因,这些差异基因在授粉过程中的表达水平都比较显著。而后,利用生物网络基因本体分析工具(BiNGO 2.3)^[12],分析拟南芥花粉管和柱头的差异基因,发现大部分的差异基因都富集在几个分类类别中,如“代谢过程”,“生物合成过程”,“细胞壁修复”,“株型细胞

壁松弛”和“细菌应对防御”。

2.3 拟南芥花粉管中乙醇二级代谢和 TCA 代谢途径上酶基因的特异表达

通过对拟南芥花粉管和柱头数据的分析,发现了一些编码催化连续反应的共表达酶的特异表达基因。

拟南芥授粉花粉管中乙醇二级代谢(如图 3): (1) AT5G63620 编码乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)(EC:1.1.1.1),催化乙醇(ethanol)转化为乙醛(acetaldehyde);(2) AT1G54100 编码乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)(EC:1.2.1.3),催化乙醛

(acetaldehyde) 转化为醋酸盐 (acetate); (3) AT5G36880 编码乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthetase) (EC:6.2.1.1), 催化醋酸盐 (acetate) 转化为乙酰辅酶 (acetyl-CoA)。

拟南芥授粉花粉管中 TCA 循环代谢 (如图 4):

(1) AT2G17130 编码异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase) (NAD⁺) (EC:1.1.1.41), 催化柠檬酸脱氢酶 (D-threo-isocitrate) 转化为 2-氧戊二酸盐 (2-oxoglutarate); (2) AT5G65750 和 AT3G55410 编码 2-氧戊二酸盐脱氢酶 E1 (2-oxoglutarate dehydrogenase E1) (EC 1.2.4.2), 催化 2-氧戊二酸盐 (2-oxoglutarate) 转化为琥珀酰辅酶 A (succinyl-CoA); (3) AT5G08300 编码琥珀酰辅酶 A 合成酶 (Succinyl-CoA synthetase) (EC 6.2.1.5), 催化琥珀酰辅酶 A (Succinyl-CoA) 转化为琥珀酸盐 (succinate); (4) AT5G66760 编码琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit) (EC 1.3.5.1), 催化琥珀酸盐 (Succinate) 转化为延胡索酸盐 (Fumarate)。

如上数据都表明:在拟南芥花粉管中,乙醇通过二级代谢可参与到 TCA 循环代谢途径中,促进花粉管中 ATP 产量的提高,为花粉管在柱头引导组织中极性、快速生长提供能量和物质保障。

2.4 拟南芥柱头中糖酵解代谢途径上酶基因的特异表达

花粉管是目前所知的生长的最快的植物细胞。而这种快速的生长模式,就需要大量的能量和物质做基础^[13]。为了满足快速生长花粉管的细胞需求,柱头中大量的蛋白质合成、生化反应等代谢途径被激活,为花粉管的快速生长提供充足的物质和能量^[14]。利用多组学网络分析的方法同样发现,在拟南芥授粉的柱头中,所编码共表达酶的基因、糖酵解的连续反应以及与能产生高能营养(乙醇)的关键酶的转录表达水平都呈现出明显升高趋势。如图 5 所示。

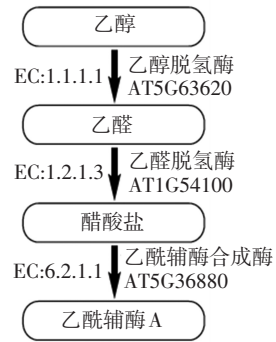


图 3 拟南芥花粉管中乙醇二级代谢

Fig.3 Ethanol degradation II in the Arabidopsis pollen tube in response to pollination

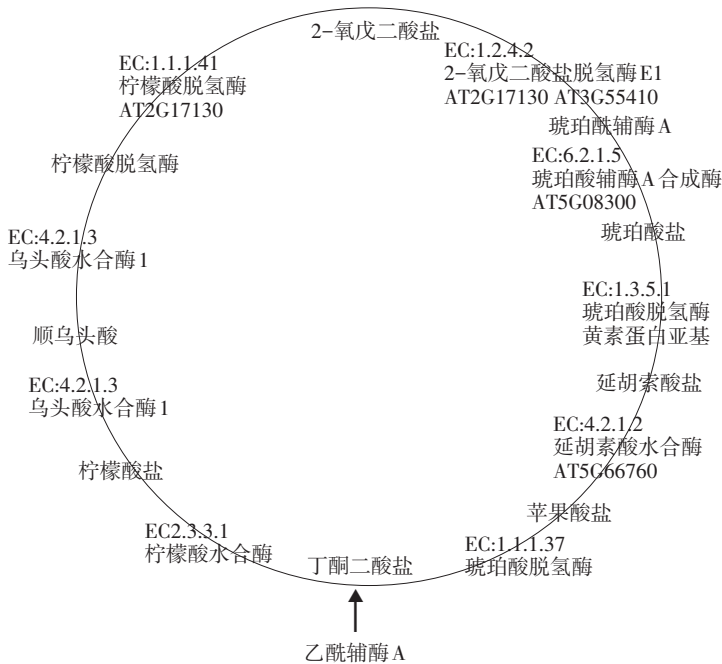


图 4 拟南芥花粉管中 TCA 循环代谢途径

Fig.4 TCA cycle variation in the Arabidopsis pollen tube in response to pollination

(1) 两个拟南芥基因 (AT1G20950 和 AT4G04040) 编码 6-磷酸果糖转磷酸酶 (fructose-6-

phosphate 1-phosphotransferase) (EC 2.7.1.90)。催化 6-磷酸果糖转磷酸酶 (fructose-6-phosphate

1-phosphotransferase) 转化为果糖(fructose-1)和磷酸(6-bisphosphate),作为糖酵解(glycolysis IV)代谢途径的最开始反应。

(2)在糖酵解代谢的第二步中,多组学网络分析表明在拟南芥中没有编码果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)(EC 4.1.2.13)的差异基因,果糖二磷酸醛缩酶可以催化果糖(fructose-1)、二磷酸(fructose-1)转化为3-磷酸甘油醛(D-glyceraldehyde 3-phosphate)。本文推断果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)可能是起因于被称为“自噬行为”的细胞降解过程。

(3)两个拟南芥基因(AT1G16300和AT1G79530)编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(GAPDH)(EC 1.2.1.12),催化D-3-磷酸甘油醛(D-glyceraldehyde 3-phosphate)转化为1,3-二磷酸-D-甘油酸(1,3-bisphospho-D-glycerate)。

(4)磷酸甘油酸激酶(Phosphoglycerate kinase)(EC 2.7.2.3),催化1,3-二磷酸-D-甘油酸(1,3-bisphospho-D-glycerate)转化为3-磷酸-D-甘油酸(3-phospho-D-glycerate)。重要的是,拟南芥的柱头中并没有发现编码磷酸甘油酸激酶的基因。而后,通过重新查找这些基因的源数据库,结果与分析发

现结论一致。

(5)AT1G09780 编码2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶(2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase)(EC 5.4.2.1),催化3-磷酸-D-甘油酸(3-phospho-D-glycerate)转化为2-磷酸-D-甘油酸(2-phospho-D-glycerate)。

(6)AT1G74030 编码烯醇酶(enolase)(EC 4.2.1.11),催化2-磷酸-D-甘油酸(2-phospho-D-glycerate)转化为磷酸烯醇丙酮酸盐(phosphoenolpyruvate)。

(7)丙酮酸激酶(pyruvate kinase)(PKM2)(EC 2.7.1.40),催化磷酸烯醇丙酮酸盐(phosphoenolpyruvate)转化为丙酮酸盐(pyruvate),是糖酵解反应最后的一个步骤。

有趣的是,在分析过程中发现了几个能产生高能营养物质(乙醇)的关键酶。首先三个拟南芥基因(AT1G04040, AT3G17790和AT3G52820)编码了酸性磷酸酶(acid phosphatase)(EC 3.1.3.2)催化磷酸单酯(phosphate monoester)转化为乙醇(ethanol)。其次,两个拟南芥基因编码了甘油磷酸二酯酶(glycerophosphodiester phosphodiesterase)(EC 3.1.4.46),催化甘油磷酸二酯酶(glycerophosphodiester)转化为乙醇(ethanol)。

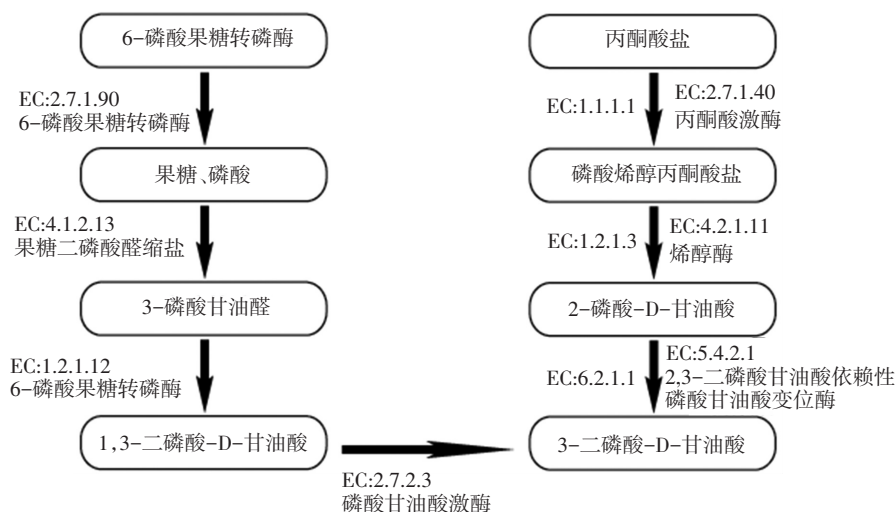


图 5 拟南芥柱头中的糖酵解代谢

Fig.5 Glycolysis-related metabolic routes in the Arabidopsis stigma in response to pollination

3 讨论

通过上面的数据分析表明:当授粉后的花粉管在柱头分泌区的细胞外基质中生长时,柱头可能确实能被激活许多代谢活动,为花粉管生长提供能量

和所需物质。例如,糖酵解相关的代谢途径被激活:糖分转化为丙酮酸,丙酮酸被进一步代谢为高能营养物质乙醇,柱头组织中的乙醇又被转运到极性、快速生长的花粉管中,参与到花粉管的 TCA 循环代谢途径,产生能量和营养物质。

根据上述分析,本文提出了拟南芥花粉管与柱

头互作的乙醇耦合模型(如图6)。

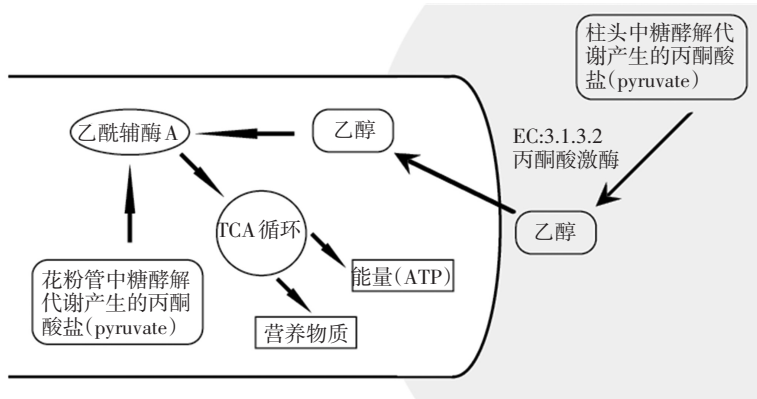


图6 拟南芥花粉管与柱头互作的乙醇代谢耦合模型

Fig.6 Ethanol metabolism coupling model between *Arabidopsis* pollen tube and stigma

花粉萌发和花粉管的快速生长是一个需要大量能量和物质的生物过程。特别是某些代谢途径,如细胞质溶质的糖酵解代谢等,这些代谢过程中产生的丙酮酸脱氢酶、TCA(柠檬酸)循环、乙醇等都对花粉管的生长有着非常重要的作用。

(1)当花粉管在柱头的引导组织中生长延长时,花粉管的延长触发了柱头引导组织中糖酵解产生的能量的转移,激活了糖类物质转化为丙酮酸盐。

(2)丙酮酸盐进一步代谢为能被花粉管吸收利用的高能营养物质乙醇。

(3)在花粉管中乙醇通过 II 级降解,进一步代谢为乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)。

(4)乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 参与到花粉管的 TCA 循环汇总,促进了 ATP 产量的增加,从而为花粉管的快速生长提供了能量保证。

综上,在拟南芥花粉管和柱头的互作生物学问题背景下,从计算系统生物学水平上,以拟南芥花粉管和柱头代谢组学数据为基础,运用多组学网络分析方法,构建了拟南芥代谢互作网络模型,进一步挖掘拟南芥花粉管和柱头在授粉过程中特异表达的基因,根据网络拓扑中的节点关联性和代谢互作网络的实际生物学问题,发现拟南芥花粉管中的乙醇和柱头中糖酵解代谢产生的被转运到花粉管中的乙醇可以参与到花粉管 TCA 循环代谢途径中,为花粉管在柱头引导组织中快速、极性生长所需要的能量和营养物质提供了保障。最后,本文建立了拟南芥花粉管和柱头互作的乙醇代谢耦合模型。

参考文献(References)

[1] HISCOCK S J, ALLEN A M. Diverse cell signaling pathways regulate pollen-stigma interactions; the search for

consensus [J]. *New Phytologist*, 2008, 179(2): 286-317.

[2] SIVITZ A B, REINDERS A, WARD J M, et al. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose induced anthocyanin accumulation [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(1): 92-100.

[3] 刘敬婧, 侯英楠, 瞿礼嘉. 高等植物受精过程中雌-雄相互作用的分子调控机制 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(10): 842-853.

LIU Jingjing, HOU Yingnan, QU Lijia. Molecular mechanisms behind the male-female interaction in fertilization in higher plants [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2013, 43(10): 842-853.

[4] WANG Y X, MAGNARD J L, MCCORMICK S, et al. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4127-4135.

[5] SWANSON R, EDLUND A F, PREUSS D. Species specificity in pollen-pistil interactions [J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 793-818.

[6] GAO X Q, ZHU D Z, ZHANG X S. Stigma factors regulating self-compatible pollination [J]. *Frontiers in Biology*, 2010, 5(2): 156-163.

[7] HIGASHIYAMA T. Peptide signaling in pollen-pistil interactions [J]. *Plant Cell Physiology*, 2010, 51(2): 177-189.

[8] BOAVIDA L C, BORGES F, BECKER J D, et al. Whole genome analysis of gene expression reveals coordinated activation of signaling and metabolic pathways during pollen-pistil interactions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(4): 2066-2080.

[9] QIN Y, LEYDON A R, MANZIELLO A, et al. Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pis-

- til [J]. *Plos Genetics*, 2009, 5(8): e1000621.
- [10] LI M N, XU W Y, YANG W Q, et al. Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma of rice [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(4):1797-1812.
- [11] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-SEQ: accounting for selection bias [J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2):R14.
- [12] MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M. Bingo: a cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(16):3448-3449.
- [13] TAYLOR L P, HEPLER P K. Pollen germination and tube growth[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48:461-491.
- [14] OBERMEYER G, FRAGNER L, LANG V, et al. Dynamic adaptation of metabolic pathways during germination and growth of lily pollen tubes after inhibition of the electron transport chain [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 1822-1833.