

乌头子根膨大过程的转录组分析

高 静, 罗 敏, 刘 然, 胡漪文, 陈丽娟, 黄 利, 王光志

(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

摘要: 对乌头子根进行转录组测序, 探讨调控乌头子根膨大的分子机制。选取乌头膨大过程的 3 个时间点即 S1 (1 D)、S2 (31 D)、S3 (61 D) 进行转录组测序, 筛选调控乌头子根膨大过程的相关差异基因, 使用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 进行验证。转录组测序组装获得 73600 条 Unigenes; 通过比较转录组分析, 得到差异表达基因 (DEGs) 一共 7555 条。S2vS1、S3vS2、S3vS1 三个比较组中分别得到 2560、2171、6320 条 DEGs。KEGG 富集分析显示差异基因主要参与了淀粉和蔗糖代谢, 植物激素信号转导, 植物-病原体作用和苯丙烷生物合成等代谢途径; 其中淀粉生物合成途径上调而木质素生物合成下调是膨大过程的主要事件。植物激素信号转导中生长素、脱落酸、细胞分裂素和赤霉素这些途径相关基因参与调控乌头子根膨大过程。筛选这些膨大相关途径的 DEGs 进行 qRT-PCR, 结果与转录组数据表达模式具有一致性。本研究首次探讨乌头子根膨大过程的动态转录变化, 挖掘参与调控乌头子根膨大过程的相关候选基因, 为进一步研究乌头子根发育调控分子机制提供线索。

关键词: 乌头; 子根发育; 膨大过程; 转录组

Transcriptome Analysis of the Expanded Daughter Root of *Aconitum carmichaelii*

GAO Jing, LUO Min, LIU Ran, HU Yi-wen, CHEN Li-juan, HUANG Li, WANG Guang-zhi

(Pharmacy School of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

Abstract: Transcriptome sequencing was performed on the daughter root of *Aconitum carmichaelii* (DR) to explore the underlying molecular mechanism regulating the root expansion. DR at three time points during the expansion stages, namely S1 (1 D), S2 (31 D) and S3 (61 D), were harvested for sequencing. The identified differentially expressed genes (DEGs) were validated by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). 73600 unigenes were obtained via *de novo* assembly, including 7555 DEGs that are differentially

收稿日期: 修回日期: 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为中药资源评价与开发利用, E-mail: gaojing@stu.cdutcm.edu.cn

通信作者: 王光志, 研究方向为药用植物资源研究, E-mail: wangguangzhi@cdutcm.edu.cn

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2021YJ0110)

Foundation project: Sichuan Provincial Science and Technology Department Applied Basic Research Project (2021YJ0110)

expressed by comparative transcriptome analysis. There were 2560, 2171 and 6320 DEGs in the three pair-wise comparison groups of S2vS1, S3vS2 and S3vS1, respectively. KEGG enrichment analysis showed that DEGs were mainly involved in starch and sucrose metabolism, plant hormone signal transduction, plant-pathogen interaction and phenylpropane biosynthesis. The genes in starch biosynthesis pathway were up-regulated and these genes in lignin biosynthesis were down-regulated, which was considered as a sign in the root expansion. The genes related to auxin, abscisic acid, cytokinin and gibberellin were involved in regulating the process of enlargement. Through testing a subset of candidate genes in these pathways using qRT-PCR, a pattern similar to that revealed by transcriptome sequencing was revealed. This study is the first to explore the dynamic transcriptional changes in the process of DR enlargement, and excavate the related genes involved in the regulation of the enlargement process, which provides clues for further research on the molecular mechanism of DR.

Keywords: *Aconitum carmichaelii*; daughter root development; expansion process; transcriptome

乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 为毛茛科常用药用植物，其母根加工作为川乌使用，其子根加工后作为附子使用^[1]。目前在四川、云南和陕西等地也有大面积栽培。乌头子根主要是由不定根膨大形成的贮藏根。贮藏根是植物为躲避恶劣地上环境进化的特殊贮藏器官。它不仅是重要的营养繁殖器官，也是人类和动物赖以生存的食物和药物来源，例如萝卜、甘薯、人参和何首乌等。随着基因组时代兴起，转录组学、蛋白质组学和代谢组学等各组学技术的使用在阐明植物生长与发育的规律方面扮演着日益重要的角色。目前甘薯、木薯和萝卜等贮藏根类食物农作物研究较多，而贮藏根类药材研究较少。乌头子根的相关研究主要集中在临床疗效和化合物活性鉴定等方面，关于其生长发育的报道较少，多停留在形态解剖学方面，缺少分子方面研究。了解植物贮藏根形成机制能够为其膨大结构的建成调控以及高产提供理论依据。课题组前期基于形态学和解剖学手段研究了乌头子根发育的过程，将乌头子根膨大过程划分为五个时期，并发现影响乌头子根膨大的因素有形成层和分生细胞活动、初生木质部脊的数目、淀粉积累和木质部木质化程度的加深等^[2]。对乌头子根三个膨大阶段即膨大初期、膨大中期和膨大后期进行转录组测序，比较乌头子根不同膨大阶段的基因转录水平差异，挖掘参与调控乌头子根膨大的相关候选基因，为提高乌头子根产量提供参考，为进一步探究乌头子根潜在膨大分子机制提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料采自四川省青川县房石镇（E104°56'58.73"，N32°21'52.93"，海拔 1039 m）当地

农民常年栽种的乌头种根,经成都中医药大学药学院王光志教授和作者鉴定为乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx.采收的种根于 2020 年 11 月 18 日栽培在成都中医药大学药用植物园内 (E103°48'18.96", N30°41'31.89", 海拔 504 m)。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

从 2021 年 3 月 6 日时部分植株的子根伸出 (1 D) 到 2021 年 8 月 4 日 (152 D) 子根成熟时期。在 1 D、31 D、61 D、121 D 时间点分别取直径为约为 1-2 mm、>4 mm、>10 mm、≥20 mm 的子根,分别命名为 S1、S2、S3、S4。用灭菌水洗净样品,用灭菌刀去除子根上部芽点、根尖和侧根,液氮速冻,置于-80℃冰箱中备用。

1.2.2 RNA 提取与测序

样品用液氮研磨成粉末,取 100 mg 按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441, 天根) 说明书进行总 RNA 提取;提取后的总 RNA 通过 Agilent 2100 检测其纯度、浓度和完整性;按照 NEB 普通建库方式进行 cDNA 建库;利用 illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序。

1.2.3 测序数据质控与组装

对每条样品的 cDNA 文库上机测序后得到的原始读段 (raw reads) 进行过滤,去除低质量、含接头和未知碱基 N 含量多的 reads,从而得到高质量读段 (clean reads)。利用 Trinity 将 clean reads 进行从头组装,得到转录本 (transcript),然后使用 Corset 软件进行聚合去冗余,获得单基因 (Unigene)。

1.2.3 Unigene 的功能注释和分类

利用 BLAST 软件将 Unigene 序列与 NR、NT、Pfam、KOG、Swiss-prot、KO、GO 等 7 个数据库中的相似序列比较,设置 blast 比对参数为 E-value<10⁻⁵ 最终获得有注释信息的基因。

1.2.4 差异表达基因分析

用 FPKM 计算基因表达量。利用 DESeq2 R 软件筛选差异基因,筛选标准为错误发现率 FDR (false discovery rate)<0.05 且 log₂ fold change 绝对值≥1。对筛选出的 DEGs 进行 KEGG 富集分析。

1.2.5 筛选与乌头子根膨大过程相关的候选基因

从 KEGG 富集的相关通路中筛选与乌头子根膨大过程相关的 DEGs。

1.2.6 qRT-PCR 验证

总 RNA 提取同 1.2.2, 1 μ g 总 RNA 用于逆转录, 方法按照成都福际去基因组第一链 cDNA 合成试剂盒说明书进行; 逆转录完毕后将 cDNA 稀释 10 倍进行 qRT-PCR, 实验过程按照 Real Time PCR Easy™-SYBR Green I 试剂盒说明书在 T100™ Thermal Cycler PCR 仪进行, 反应条件为两步法: 95°C、3 min; 95°C、5 s, 60°C、30 s, 40 个循环。以 *ACTIN* (肌动蛋白基因) 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量。为确保实验的重现性和可靠性, 对样品进行三个生物重复和三次技术重复。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物设计

Table 1 Design of qRT-PCR primer

Gene ID	Description	Abbreviation	Primer
Cluster-5683.29966	肌动蛋白 (ACTIN)	ACT	F 5'-ACAGGACCAATCAATACTCAC-3'
			R 5'-TGGCTTCCCTTAGCACAT-3'
Cluster-5683.36937	转录抑制响应 1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1)	TIR1	F 5'-CCATACCACGACTTACACA-3'
			R 5'-AATCTCCTTCACTCACTTCC-3'
Cluster-5683.15057	生长素响应因子 (SMALL AUXIN UP RNA)	SAUR	F 5'-GCAGTATATGTAGGAGAGGGTGAG-3'
			R 5'-CCGAGATGTGAGGTTGACGAA-3'
Cluster-5683.37263	生长素响应因子 (AUXIN RESPONSE FACTOR)	ARF	F 5'-TTGTTTACACCGATCACG-3'
			R 5'-TTCTGTCAATGCCTCTTC-3'
Cluster-5683.32278	细胞分裂素 A 类响应因子 (TYPE-A ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR)	ARR-A	F 5'-TTTGAAGAAGGGGCAGAGG-3'
			R 5'-GGATGACAGAGTTGACAGGGG-3'
Cluster-5683.17816	ABA 反应元件结合因子 (ABA RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR)	ABF	F 5'-TGGCGGTATAGTCGGTGAAG-3'
			R 5'-TGTAGCGGATTCTCTGTTCTTG-3'
Cluster-5683.10302	光敏色素相互作用因子 4 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4)	PIF4	F 5'-GTTAATCGGTCTATCGCCTCTG-3'
			R 5'-ACTTGCTGCTTGGTGTATTCTC-3'
Cluster-5683.36484	1,4- α -葡聚糖分支酶 (1,4-ALPHA-GLUCAN BRANCHING ENZYME)	GBE1	F 5'-CTTACCGAGCACATCTTGATTATC-3'
			R 5'-TGACGAGCCATCCACATTG-3'
Cluster-5683.47197	淀粉合酶 (STARCH SYNTHASE)	GLGA	F 5'-GGAGCCAGCAACAACCTTACG-3'
			R 5'-CCAGACCATAACCACTTCAATG-3'
Cluster-5683.34778	葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶 (GLUCOSE-1-PHOSPHATE ADENYLYLTRANSFERASE)	GLGC	F 5'-GGAGCACAACACATGGAATACT-3'
			R 5'-CGTCCTTCTTCGTCAATCTTCA-3'
Cluster-5683.42210	苯丙氨酸解氨酶 (PHENYLALANINE AMMONIALYASE)	PAL	F 5'-TAATGAGGCGAAGGTGGAGTT -3'
			R 5'-TGCGTGGGTTGATTCACTCT-3'

Cluster-5683.31175	肉桂醇脱氢酶	CAD	F 5'-ATCACACCCTCTCTTGCCATT-3'
	(CINNAMYL-ALCOHOL DEHYDROGENASE)		R 5'-CGCCTATTCCACTTCCACCTA-3'
Cluster-5683.33017	细胞周期蛋白	CYCD3	F 5'-AGCACCTCATCATCTCCATCTTC-3'
	(CYCLIN D3)		R 5'-ATCCACTCTCAGTATCCATTCCA-3'
Cluster-5683.30404	KNOX1 同源异型盒蛋白	KNAT1	F 5'-CCTTCACATCCTCTTCATCT-3'
	(HOMEODOMAIN PROTEIN KNOTTED-1-LIKE 1)		R 5'-CAGTCAGCCTGTTCACTAT-3'

2 结果与分析

2.1 乌头子根转录组测序结果与功能注释

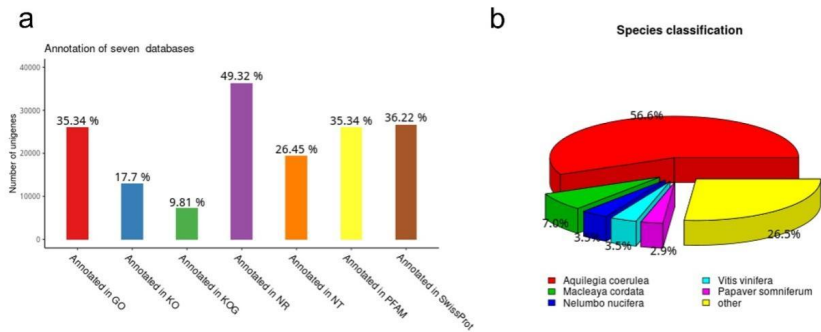
通过质控，共产生 56 Gb 的有效数据，详见表 2。组装后产生 73600 条 Unigenes，41768 条 Unigenes（56.75%）可以比对到 NR、NT、Pfam、KOG、Swiss-prot、KO 和 GO 等公共数据库（图 1A），分别注释了 36304 条（49.32%）、19470 条（26.45%）、26015 条（35.34%）、7224 条（9.81%）、26662 条（36.22%）、13033 条（17.7%）和 26013 条（35.34%）Unigenes。NR 数据库注释到基因同源物种分布如图 1B 所示，前五分别为耧斗菜（*Aquilegia coerulea*）、博落回（*Macleaya cordata*）、莲（*Nelumbo nucifera*）、葡萄（*Vitis vinifera*）、罂粟（*Papaver somniferum*）。

表 2 乌头子根的转录组数据统计结果
Table 2 Transcriptome data of DR

sample	raw_reads	clean_reads	clean_bases	Q20/%	Q30/%	GC/%
S1_1	20949881	20104026	6	96.97	91.98	45.71
S1_2	23080486	22107075	6.6	97.1	92.23	46.01
S1_3	21781232	20766359	6.2	97.19	92.45	46.03
S2_1	21741614	20851993	6.3	97.18	92.39	45.76
S2_2	22036972	21173324	6.4	97.22	92.55	46.27
S2_3	21639746	21258695	6.4	97.36	92.62	45.52
S3_1	22250881	21277173	6.4	97.07	92.16	45.78
S3_2	20212078	19164699	5.7	97.15	92.39	45.71
S3_3	20604735	19922852	6	97.01	92.09	45.77

2.2 差异基因表达分析

通过分析比较转录组数据，获得差异表达基因（differential expression genes, DEGs）共



A: 7 条数据库的 Unigenes 功能注释; B: NR 数据库的物种注释分布

A: Functional annotated Unigenes diagram from 7 databases; .B: Distribution of species in NR databases

图 1 Unigenes 的功能注释

Figure 1 Functional annotation of Unigenes

7555 条; S2vS1 存在 2560 条 DEGs, 619 条表达上调, 1941 条表达下调; S3vS2 存在 2171 条 DEGs, 1046 条表达上调, 1125 条表达下调; S3vS1 存在 6320 条 DEGs, 2194 条表达上调, 4126 条表达下调, 见表 3。大量 DEGs 集中在 S3vS1, 在 S2vS1 中 DEGs 少, 在 S3vS2 中 DEGs 较少; 所有 DEGs 中, 下调多于上调 (表 3)。

表 3 差异基因表达分析

Table 3 Differential expression gene analysis

Compare	All DEGs	Up DEGs	Down DEGs
S2vS1	2560	619	1941
S3vS1	6320	2194	4126
S3vS2	2171	1046	1125

2.3 差异表达基因 KEGG 富集分析

S2vS1、S3vS1、S3vS2 三个比较组的 DEGs 分别注释到 87、110、95 条代谢通路。图 2/3/4 均只显示前 20 条代谢通路。图 2 显示在 S2vS1 中 DEGs 在苯丙烷生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis, ko00940) 最多, 为 38 个, 然后依次为植物-病原体作用 (Plant-pathogen interaction, ko04626) 与淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism, ko00500), 分别为 34 和 33 个。此外, 植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction, ko04075) 也显著富集, 为 30 个。在 S3vS1 (图 3), 富集 DEGs 数量排名前三的代谢通路为淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷生物合成、植物激素信号转导分别有 85 个、72 个、61 个。在

S3vS2（图 4），依次为内质网中的蛋白质加工（Protein processing in endoplasmic reticulum, ko04141）、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢，分别有 33 个、32 个、25 个。在这三个比较组，DEGs 主要富集于“苯丙烷生物合成”和“淀粉和蔗糖代谢”。这两个途径可能参与调控乌头子根膨大过程。

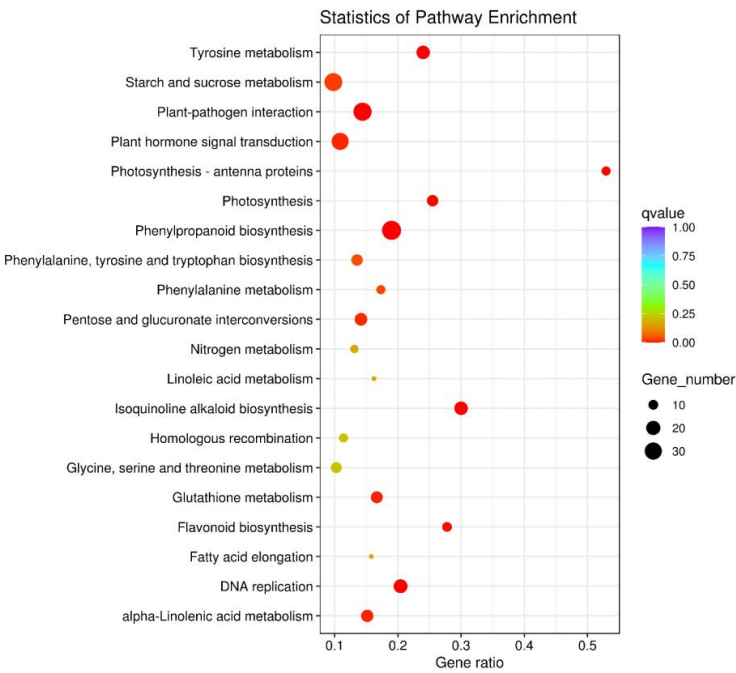


图 2 S2vS1 的 KEGG 富集结果
Figure 2 KEGG results of S2vS1

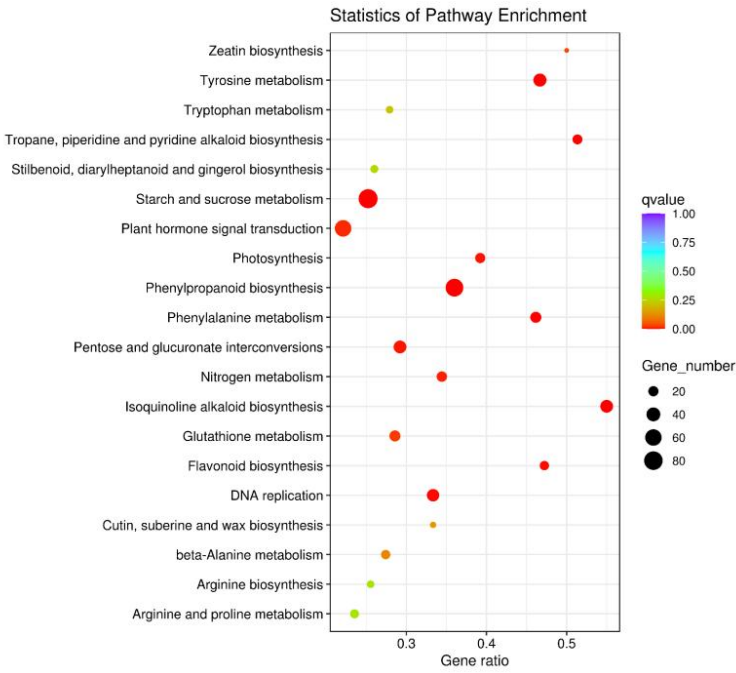


图 3 S3vS1 的 KEGG 富集结果
Figure 3 KEGG results of S3vS1

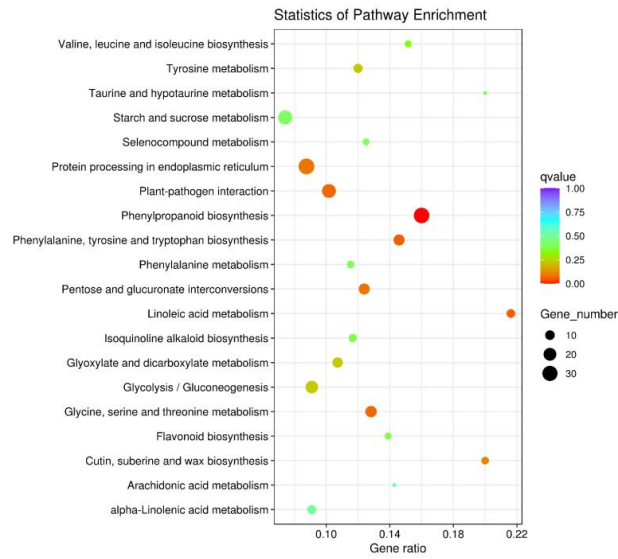


图 4 S3vS2 的 KEGG 富集结果
Figure 4 KEGG results of S3vS2

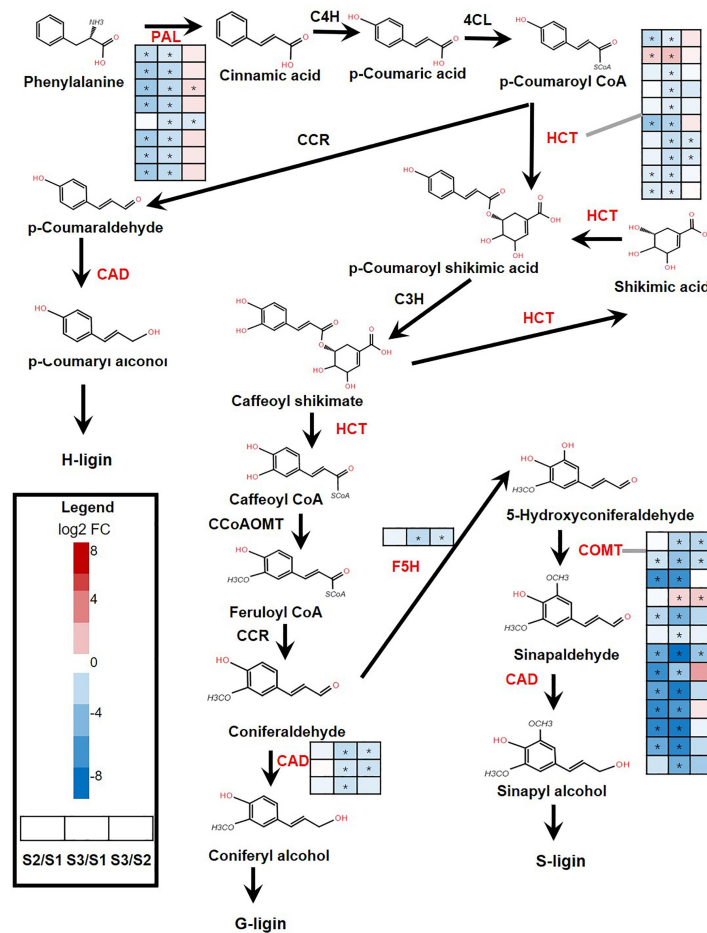


图 5 乌头子根木质素生物合成途径
Figure 5 Biosynthetic pathway of lignin in DR

2.4 与乌头子根膨大过程相关的候选基因

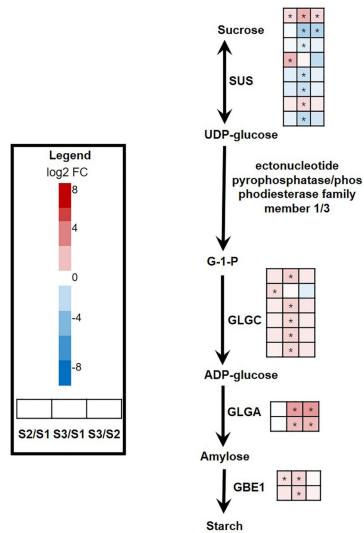


图 6 乌头子根淀粉合成途径

Figure 6 Biosynthetic pathway of starch in DR

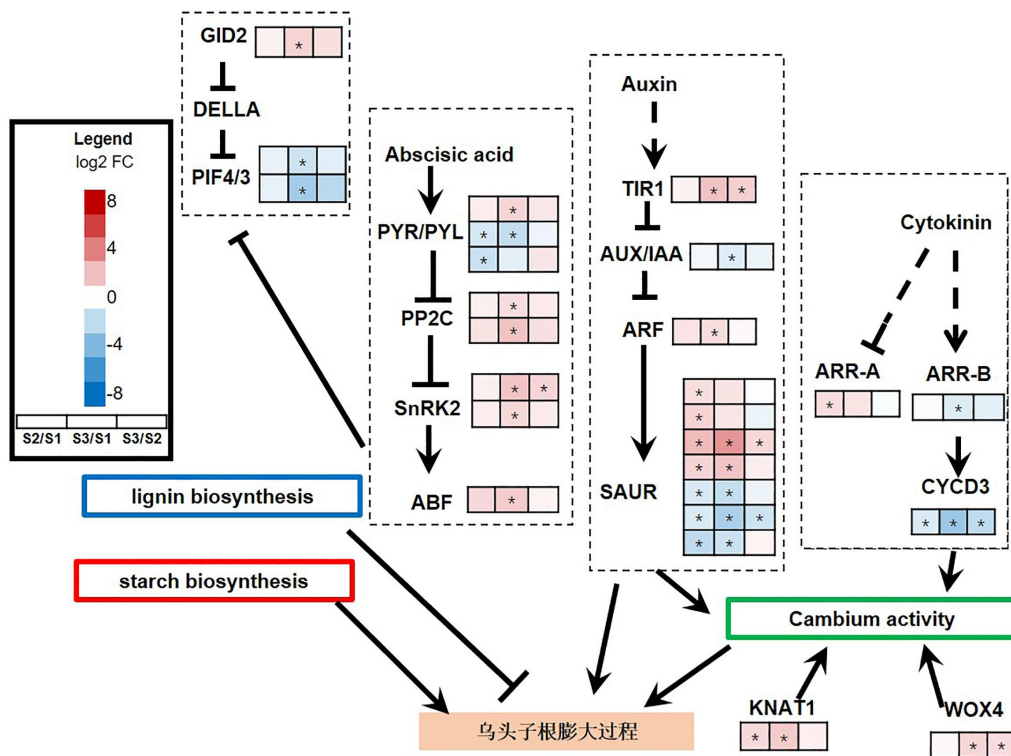


图 7 相关差异基因对乌头子根膨大过程的调控

Figure 7 Regulation of related DEGs on expansion process in DR

苯丙烷生物合成途径是合成木质素的重要部分，木质素参与植物细胞次生壁的形成。前人研究发现细胞木质化抑制甘薯块根的发育^[3]。课题组前期研究发现木质部木质化程度影响乌头子根膨大程度^[2]，因此木质素生物合成影响乌头子根的膨大。图 5 所示为木质素生物合

成途径, *PAL*、*HCT*、*CAD*、*COMT* 和 *F5H* 等编码乌头子根木质素生物合成的关键酶基因被注释到该通路（图 5）。这些基因均在 S3/S1 表达下调。

KEGG 分析富集到淀粉和蔗糖代谢通路。乌头子根储藏的主要营养物质是淀粉^[2,4,5]。如图 6 所示, *SUS*、*GLGC*、*GLGA* 和 *GBE1* 等这些部分潜在 DEGs 被注释到参与乌头子根淀粉合成通路。*SUS* 在 S3/S1 总体下调, 部分上调, *GLGA* 和 *GBE1* 在 S2/S1 和 S3/S1 表达显著上调。

KEGG 分析富集到植物激素信号转导通路中, DEGs 主要富集于生长素、细胞分裂素、赤霉素和脱落酸信号通路。随着乌头子根直径增加, 生长素信号总体基因转录水平升高, *TIR1* 和 *ARF* 在 S3/S1 显著上调, *AUX/IAA* 在 S3/S1 显著下调, *SAURs* 中 4 个基因在 S2/S1 上调。随着乌头子根直径增加, 细胞分裂素信号总体基因转录水平下降, *ARR-A* 在 S2/S1 显著上调, *ARR-B* 在 S3/S1 显著下调, *CYCD3* 在 S2/S1、S3/S1 和 S3/S1 均显著下调。赤霉素信号总体转录水平下降, 编码 DELLA 蛋白的基因未有差异表达, 只有 *GID2* 与 *PIF3/4* 在 S3/S1 显著下调。脱落酸信号转录水平上升, 编码 ABA 受体 PYR/PYLs 的基因在 S2/S1 显著上调, 编码磷酸酶 PP2Cs、编码蛋白激酶 SnRK2s、编码 ABA 响应转录因子的基因在 S3/S1 上调。

转录因子 WOX 和 KNOX 参与调节形成层发育和维管组织分化。有一条作用途径即 CLE41/44-PXY/TDR-WOX4 已受到广泛认可^[6-10], 在乌头子根膨大过程转录组数据中, 无基因注释到 *CLE41/44* 和 *PXY*; *TDR* 有注释, 但无差异表达。*WOX4* 在 S3/S1 和 S3/S2 显著上调。*KNOX1* 主要在顶端分生组织的维持和侧生器官的发育中发挥重要作用^[11]。*KNAT1* 属于 *KNOX1* 基因家族成员。*KNAT1* 与 *WOX4* 在 S3/S1 时显著上调。

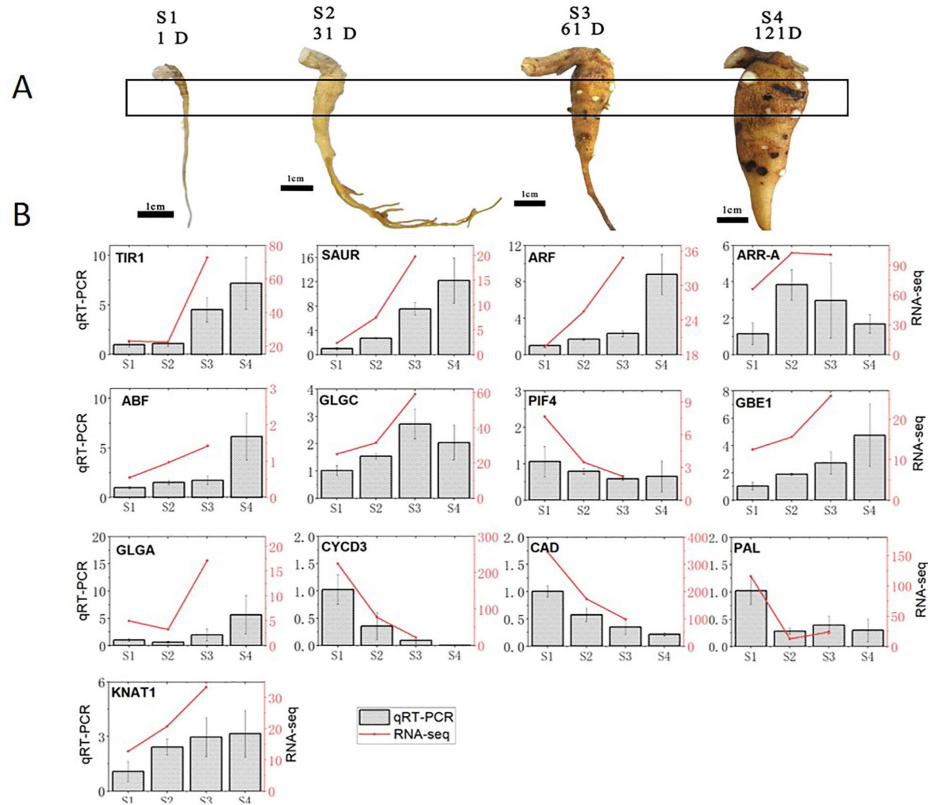


图 8 RNA-seq 与 qRT-PCR 结果比较

Figure 8 Comparison of RNA-seq and qRT-PCR results

2.5 qRT-PCR 验证

为验证转录组数据结果的可靠性，从 KEGG 富集通路中筛选出 13 条与子根膨大相关候选基因进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 的基因相对表达量均以 S1 为对照组计算所得的结果。RNA-seq (FPKM) 与 qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 两者表达趋势均一致，如图 8 所示，这表明本研究通过 RNA-Seq 获得的数据集进行的分析是可靠的。另外，图 8 补充了乌头子根直径无显著变化的膨大相关基因表达情况。生长素信号 *TIR1*、*SAUR*、*ARF* 和脱落酸信号 *ABF* 和淀粉合成基因如 *GBE1*、*GLGA*、形成层活动基因如 *KNAT1* 等 7 个基因相对表达量逐渐呈上升趋势，在 121 D 相对表达量最高，与子根膨大正相关；木质素生物合成基因 *CAD* 和细胞周期基因 *CYCD3* 等 2 个基因表达呈下降趋势，在 121 D 相对表达量最低，与子根膨大负相关，进一步验证大部分基因与膨大相关。

3 讨论

KEGG 功能富集显示乌头子根膨大过程不仅涉及蔗糖和淀粉合成和代谢、苯丙烷生物合成等初级代谢途径，还涉及植物激素信号转导。这些结果在甘薯^[12,13]、木薯^[14-16]、胡萝卜^[17]

和其他贮藏地下器官^[17]通过比较转录组中得出的结果类似。

3.1 膨大初期特征

S1 为乌头子根膨大初期建立时间点即 1 D。在该时间点，取根直径约为 1-2 mm，显微观察到乌头子根开始次生生长，次生形成层片段逐渐建成，薄壁细胞开始积累淀粉^[2]。*PAL*、*HCT*和 *COMT*等基因在 S1 转录活动最旺盛，可能是参与木质部导管和纤维建成的主要基因。植物激素是影响块根形成和发育的关键因素。Utsumi 等^[15]探讨了植物激素对木薯块根生长的影响，生长素、细胞分裂素、油菜素内酯处理通过信号转导可促进木薯块根直径增加。Immanen 等^[19]发现生长素在毛心杨（*Populus trichocarpa*）茎形成层浓度梯度最高，细胞分裂素高分布于靠近形成层的韧皮部，赤霉素在靠近形成层的木质部分布高，细胞分裂素生物合成的增加刺激了形成层细胞分裂率。生长素和细胞分裂素对形成层的发育有着重要作用。Randall 报道 *ANT* 与 *CYCD3;1* 独立且冗余响应细胞分裂素对拟南芥根次生生长的调控^[20]。Liu 等^[21]发现，细胞周期相关基因 *CYCD3;1* 和 *CYCD3;2* 在细胞分裂素突变体 *ahk2, 3, 4* 及 B 类响应因子突变体 *arr1, 10* 和 *arr10, 12* 的表达与野生型相比显著降低。在 S1 时，受细胞分裂素信号调控的 *CYCD3* 表达水平高，推测 *CYCD3* 参与乌头子根膨大初期次生形成层的建立。

3.2 膨大中期特征

S2 是乌头子根膨大中期发生时间点即 31 D，膨大中期的直径范围为 4-10 mm。取根直径 >4 mm，显微观察显示根内次生形成层成环，淀粉大量积累在韧皮部，韧皮部扩大，出现大量侧根^[2]。*ARR-As* 能促进初生根伸长和侧根形成^[22]。在 S2 时，子根不断向下伸长，侧根不断从子根产生代替子根担负运输水分和无机盐的职能，*ARR-A* 表达最旺盛，在 S4 时侧根产生少，*ARR-A* 表达低（图 8），说明 *ARR-A* 在 S2 时可能有同样的功能，对侧根的产生有促进作用。拟南芥 *SAURs* 中的 *SAUR19*、*41* 和 *63* 通过调节生长素运输促使细胞扩张^[23-25]。另外，*SAUR41* 还能促进侧根形成^[22]。乌头子根在 S2 时出现明显膨大，可能与上调的 *SAURs* 相关。

3.3 膨大后期特征

S3 是乌头子根膨大后期发生时间点即 61 D，膨大后期的直径范围为 10 mm 以上。取根直径 >10 mm，显微观察到次生形成层被推向外侧，木质部逐渐扩大，根内部次生形成层环呈圆形、多角形或分离形，淀粉继续积累^[2]。与 S1 相比，在 S3 中相关通路 DEGs 有显著表达差异（图 5、6 和 7）。*PAL*、*HCT*、*CAD*、*COMT* 和 *F5H* 等木质素合成关键酶基因表达情况与 S1 相反，均显著表达下调；*GLGC*、*GLGA* 和 *GBE1* 等淀粉合成关键酶基因则显著表

达上调。伴随着甘薯块根的发育,淀粉合成相关基因上调和木质素合成相关基因下调^[12]。该现象在乌头子根中也存在。研究发现淀粉和木质素含量和基因呈负相关^[12,26,27]。Wang 等人^[28]认为木质素和淀粉之间存在密切的碳动态转化,但是这两者内在调控机制还未有相关报道。

近年来有研究报道脱落酸不仅通过调控同化物的卸载,从而促进淀粉合成^[29,30],而且拮抗赤霉素促进细胞伸长作用^[31-33],从而影响块根/茎发育^[34]。在马铃薯中,GAs/ABA 比值大,则块茎个头小并纵向伸长;比值小,块茎径向增粗^[35]。脱落酸信号途径在 S3/S1 表达旺盛,可能通过抑制赤霉素信号中 *PIF3/4* 表达,从而使得细胞径向伸长。生长素信号对形成层发育极其重要^[36]。拟南芥中不同的 *ARF* 有着不同的作用。Brackmann 等^[37]发现,*ARF3* 和 *ARF4* 能促进形成层活动而 *ARF5* 抑制形成层活动。Mehdi 等^[38]认为 *ARF6* 和 *ARF8* 通过抑制形成层细胞向韧皮部的分化,从而导致形成层细胞向木质部分化的转变。与 S1 相比,*ARF* 在 S3 表达最高,表明 *ARF* 可能促进膨大后期的木质部分化。

在拟南芥中,*KNAT1* 调控下胚轴次生分生组织木质部纤维的分化^[39];但是在地上部分时,*BP* (*KNAT1* 也被称为 *BP*) 过表达减少木质化的细胞产生^[40]。*WOX4* 与 *KNAT1* 突变,导致根中的维管形成层活性丧失^[41]。Rüscher 等^[14]认为 *KNOX/BEL* 基因包括 *KNAT1*、*PNY* 和 *PNF* 对木质部薄壁细胞分化有着重要作用。*KNAT1* 在不同植物或同一种植物的不同部位作用有所不同。在 S3 时,形成层活动旺盛,木质部逐渐扩大,其中薄壁细胞也在不断被分化,*KNAT1* 表达水平高,推测 *KNAT1* 在乌头子根中可通过促进形成层活性和木质部薄壁细胞分化从而促进乌头子根膨大。木质部扩张是膨大后期直径增加的关键,*ARF* 和 *KNAT1* 在 S4 表达最高,说明 *ARF* 和 *KNAT1* 可能是木质部扩张调控的关键转录因子。

S4 是乌头子根直径无显著变化时间点即 121 D,取根直径 ≥ 20 mm,显微观察显示根内部次生形成层环依然呈圆形、多角形或分离形,木质部完成扩张。qRT-PCR 结果显示大部分膨大相关候选基因的相对表达量在 S4 时上升,进一步验证这些基因与乌头子根膨大相关。

综上,本研究首次通过转录组测序挖掘与乌头子根膨大相关的候选基因,并经 qRT-PCR 获得乌头子根发育相关调控基因的相对基因表达量变化规律。但存在一些不足。第一,未测定 S1 至 S4 时间点植物激素、淀粉、木质素含量和相关酶变化等生理指标,为转录组数据提供进一步证据。第二,本研究对乌头子根膨大分子机制只是一个初步探索。乌头子根膨大具体机制还不够清晰,需更深层次调控机制的挖掘如蛋白质组和代谢物组的进一步证据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 41, 201.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia 2020. Vol I. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 41, 201.
- [2] Gao J, Liu R, Luo M, Wang G. The clonal growth in *Aconitum carmichaelii* Debx. Plant Signaling & Behavior, 2022, 17(1): 2083818. DOI:10.1080/15592324.2022.2083818
- [3] Togari Y. A study of tuberous root formation in sweet potato. Bulletin of National Agricultural Experimental Station, Tokyo, 1950, 68: 1-96.
- [4] 胡清如. 北乌头附子发育过程中的淀粉动态. 西北大学学报, 1992, 22(2): 204-208.
- Hu Q R. Development and Dynamic Changes in the Starch Distribution of the Monkshod-tuber of *Aconitum kusnezoffii*. Journal of Northwestern University, 1992, 22(2): 204-208.
- [5] Xia Y, Gao W, Jiang Q, Li X, Huang L, Xiao P. Comparison of the physicochemical and functional properties of *Aconitum carmichaelii* and *Aconiti lateralis* Preparata starches. Starch/Stärke, 2011, 63: 765-770. DOI:10.1002/star.201100062
- [6] Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2010, 22(8): 2618-2629. DOI:10.1105/tpc.110.076083
- [7] Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. Regulation of vascular development by CLE peptide-receptor systems. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(1): 8-16. DOI:10.1111/j.1744-7909.2010.00904.x
- [8] Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y, Fukuda H. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States Of America, 2008, 105(39): 15208-15213. DOI:10.1073/pnas.0808444105
- [9] Kuznetsova K A, Dodueva I E, Pautov A A, Krylova E G, Lutova L A. Genetic Control of Storage Root Development. Russian Journal of Plant Physiology, 2020, 67(4): 589-605. 10.1134/s102144372004010x
- [10] Etchells J P, Smit M E, Gaudinier A, Williams C J, Brady S M. A brief history of the TDIF-PXY signalling module: balancing meristem identity and differentiation during vascular development. New Phytologist, 2016, 209(2): 474-484. DOI:10.1111/nph.13642
- [11] Scofield S, Dewitte W, Murray J A. The KNOX gene *SHOOT MERISTEMLESS* is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 2007, 50(5): 767-781. 10.1111/j.1365-313X.2007.03095.x
- [12] Firon N, Labonte D, Villordon A, Kfir Y, Solis J, Lapis E. Transcriptional profiling of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots indicates down-regulation of lignin biosynthesis and up-regulation of starch biosynthesis at an early stage of storage root formation. BMC Genomics 2013, 14(1): 460. DOI:10.1186/1471-2164-14-460
- [13] 周梓楠, 潘家荃, 刘冠求, 万博, 王凯, 于涛. 甘薯响应冷胁迫的转录组分析. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4): 1202-1212.
- Zhou H N, Pan J H, Liu G Q, Wan B, Wang K, Yu Tao. Transcriptome analysis of sweetpotato under low temperature stress. Journal of Plant Genetic Resources. 2022, 23(4): 1202-1212.
- [14] Ruscher D, Corral J M, Carluccio A V, Klemens P a W, Gisel A, Stavalone L, Neuhaus H E, Ludewig F, Sonnewald U, Zierer W. Auxin signaling and vascular cambium formation enable storage metabolism in cassava tuberous roots. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(10): 3688-3703. DOI:10.1093/jxb/erab106
- [15] Utsumi Y, Tanaka M, Utsumi C, Takahashi S, Matsui A, Fukushima A, Kobayashi M, Sasaki R, Oikawa A, Kusano M, Saito K, Kojima M, Sakakibara H, Sojikul P, Narangajavana J, Seki M. Integrative omics approaches revealed a crosstalk among phytohormones during tuberous root development in cassava. Plant Molecular Biology, 2022, 109(3): 249-269. DOI:10.1007/s11103-020-01033-8
- [16] Ding Z, Fu L, Tie W, Yan Y, Wu C, Dai J, Zhang J, Hu W. Highly dynamic, coordinated, and stage-specific profiles are revealed by a multi-omics integrative analysis during tuberous root development in cassava. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(22): 7003-7017. DOI:10.1093/jxb/eraa369
- [17] Wang S, Wang X, He Q, Liu X, Xu W, Li L, Gao J, Wang F. Transcriptome analysis of the roots at early and late seedling stages using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in radish. Plant Cell Reports, 2012, 31(8): 1437-1447. DOI:10.1007/s00299-012-1259-3

- [18] Tang J R, Lu Y C, Gao Z J, Song W L, Wei K H, Zhao Y, Tang Q Y, Li X J, Chen J W, Zhang G H, Long G Q, Fan W, Yang S C. Comparative transcriptome analysis reveals a gene expression profile that contributes to rhizome swelling in *Panax japonicus* var. *major*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 2019, 154(4): 515-523.
- [19] Immanen J, Nieminen K, Smolander O P, Kojima M, Alonso Serra J, Koskinen P, Zhang J, Elo A, Mahonen A P, Street N, Bhalerao R P, Paulin L, Auvinen P, Sakakibara H, Helariutta Y. Cytokinin and Auxin Display Distinct but Interconnected Distribution and Signaling Profiles to Stimulate Cambial Activity. *Current Biology*, 2016, 26(15): 1990-1997. DOI:10.1016/j.cub.2016.05.053
- [20] Randall R S, Miyashima S, Blomster T, Zhang J, Elo A, Karlberg A, Immanen J, Nieminen K, Lee J Y, Kakimoto T, Blajecka K, Melnyk C W, Alcasabas A, Forzani C, Matsumoto-Kitano M, Mahonen A P, Bhalerao R, Dewitte W, Helariutta Y, Murray J A. *AINTEGUMENTA* and the D-type cyclin *CYCD3;1* regulate root secondary growth and respond to cytokinins. *Biology Open*, 2015, 4(10): 1229-1236. DOI:10.1242/bio.013128
- [21] Liu H, Zhang H, Dong Y X, Hao Y J, Zhang X S. *DNA METHYLTRANSFERASE1*-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2018, 217(1): DOI:219-232. 10.1111/nph.14814
- [22] Ren B, Liang Y, Deng Y, Chen Q, Zhang J, Yang X, Zuo J. Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Research*, 2009, 19(10): 1178-1190. DOI:10.1038/cr.2009.88
- [23] Chae K, Isaacs C G, Reeves P H, Maloney G S, Muday G K, Nagpal P, Reed J W. *Arabidopsis* *SMALL AUXIN UP RNA63* promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *The Plant Journal*, 2012, 71(4): 684-697. DOI:10.1111/j.1365-313X.2012.05024.x
- [24] Spartz A K, Lee S H, Wenger J P, Gonzalez N, Itoh H, Inze D, Peer W A, Murphy A S, Overvoorde P J, Gray W M. The *SAUR19* subfamily of *SMALL AUXIN UP RNA* genes promote cell expansion. *The Plant Journal*, 2012, 70(6): 978-990. DOI:10.1111/j.1365-313X.2012.04946.x
- [25] Kong Y, Zhu Y, Gao C, She W, Lin W, Chen Y, Han N, Bian H, Zhu M, Wang J. Tissue-specific expression of *SMALL AUXIN UP RNA41* differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 2013, 54(4): 609-621. DOI:10.1093/pcp/pct028
- [26] Sun J, Hui K, Guo Z, Li Y, Fan X. Cellulose and Lignin Contents are Negatively Correlated with Starch Accumulation, and Their Correlation Characteristics Vary Across Cassava Varieties. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022. DOI:10.1007/s00344-022-10573-w
- [27] Singh V, Zemach H, Shabtai S, Aloni R, Yang J, Zhang P, Sergeeva L, Ligterink W, Firon N. Proximal and Distal Parts of Sweetpotato Adventitious Roots Display Differences in Root Architecture, Lignin, and Starch Metabolism and Their Developmental Fates. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 609923. DOI:10.3389/fpls.2020.609923
- [28] Wang H, Yang J, Zhang M, Fan W, Firon N, Pattanaik S, Yuan L, Zhang P. Altered Phenylpropanoid Metabolism in the Maize Lc-Expressed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) Affects Storage Root Development. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18645. DOI:10.1038/srep18645
- [29] 史春余, 王振林, 郭风法, 余松烈. 甘薯块根膨大过程中 ATP 酶活性、ATP 和 ABA 含量的变化. *西北植物学报*, 2002, 22(2): 315-320.
- Shi C Y, Wang Z L, Guo F F, Yu S L Changes of ATPase activity, ATP and ABA content in storage roots during storage root thickening of sweet potato. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(2): 315-320.
- [30] Huang H H, Xie S D, Xiao Q L, Wei B, Zheng L J, Wang Y B, Cao Y, Zhang X G, Long T D, Li Y P, Hu Y F, Yu G W, Liu H M, Liu Y H, Huang Z, Zhang J J, Huang Y B. Sucrose and ABA regulate starch biosynthesis in maize through a novel transcription factor, *ZmEREB156*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27590. DOI:10.1038/srep27590
- [31] Razem F A, Baron K, Hill R D. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(5): 454-459. DOI:10.1016/j.pbi.2006.07.007
- [32] Shu K, Zhou W, Chen F, Luo X, Yang W. Abscisic Acid and Gibberellins Antagonistically Mediate Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 416. DOI:10.3389/fpls.2018.00416
- [33] Xu X, Lammeren A M V, Vermeer E, Vreugdenhil D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiology*, 1998, 117: 575-584. DOI:10.1104/pp.117.2.575

- [34] Chen P, Yang R, Bartels D, Dong T, Duan H. Roles of Absciscic Acid and Gibberellins in Stem/Root Tuber Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4955. DOI:10.3390/ijms23094955
- [35] 胡月清. GA3 和 ABA 对马铃薯薯形的影响. *江苏农业科学*, 2019, 47(18): 125-128.
- Hu, Y Q. Effect of GA3 and ABA on potato shape. *Jiangsu Agricultural Science*, 2019, 47(18): 125-128.
- [36] Smetana O, Makila R, Lyu M, Amiryousefi A, Sanchez Rodriguez F, Wu M F, Sole-Gil A, Leal Gavarron M, Siligato R, Miyashima S, Roszak P, Blomster T, Reed J W, Broholm S, Mahonen A P. High levels of auxin signalling define the stem-cell organizer of the vascular cambium. *Nature*, 2019, 565(7740): 485-489. DOI:10.1038/s41586-018-0837-0
- [37] Brackmann K, Qi J, Gebert M, Jouannet V, Schlamp T, Grunwald K, Wallner E S, Novikova D D, Levitsky V G, Agusti J, Sanchez P, Lohmann J U, Greb T. Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 875. DOI:10.1038/s41467-018-03256-2
- [38] Brackmann K, Qi J, Gebert M, Jouannet V, Schlamp T, Grunwald K, Wallner E S, Novikova D D, Levitsky V G, Agusti J, Sanchez P, Lohmann J U, Greb T. Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 875. DOI:10.1038/s41467-018-03256-2
- [39] Liebsch D, Sunaryo W, Holmlund M, Norberg M, Zhang J, Hall H C, Helizon H, Jin X, Helariutta Y, Nilsson O, Polle A, Fischer U. *Class I KNOX* transcription factors promote differentiation of cambial derivatives into xylem fibers in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Development*, 2014, 141(22): 4311-4319. DOI:10.1242/dev.111369
- [40] Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S. The knotted1-like homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes & Development*, 2003, 17(17): 2088-2093. DOI:10.1101/gad.1120003
- [41] Zhang J, Eswaran G, Alonso-Serra J, Kucukoglu M, Xiang J, Yang W, Elo A, Nieminen K, Damen T, Joung J G, Yun J Y, Lee J H, Ragni L, Barbier De Reuille P, Ahnert S E, Lee J Y, Mahonen A P, Helariutta Y. Transcriptional regulatory framework for vascular cambium development in *Arabidopsis* roots. *Nature Plants*, 2019, 5(10): 1033-1042. DOI:10.1038/s41477-019-0522-9