

殷剑美, 张 铅, 蒋 璐, 等. 山药块茎发育阶段基因共表达网络构建及阶段特异性分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 30-38.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.01.004

山药块茎发育阶段基因共表达网络构建及阶段特异性分析

殷剑美, 张 铅, 蒋 璐, 张培通
(江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 山药是一种药食同源作物, 块茎是其主要产品器官, 其发育机制对于山药产量和品质提升相关育种有着重要的指导作用。以不同生长阶段(块茎膨大第1 d、第11 d、第21 d、第31 d、第41 d、第51 d, $T_1 \sim T_6$)的山药块茎为材料进行转录组测序, 经从头(*de novo*)组装后获得42 042个 unigenes, 利用七大数据库进行注释, 鉴定后发现山药块茎形成过程中涉及大量基因, 包括激素合成、信号转导等相关基因。阶段特异性分析结果表明, 块茎形成初始阶段为块茎发育的关键时期; 加权基因共表达网络分析结果表明, 在山药块茎形成初期及后期, 激素相关基因的表达特别活跃, 脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)是山药块茎生长发育的重要激素。研究结果为进一步研究山药块茎膨大分子机制奠定了基础。

关键词: 山药; 转录组测序; 阶段特异性基因; 基因共表达网络

中图分类号: S632.101 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2022)01-0030-09

Stage-specific and weighted gene co-expression network analyses of yam (*Dioscorea alata* L.) tuber growth

YIN Jian-mei, ZHANG Qian, JIANG Lu, ZHANG Pei-tong
(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Chinese yam is a crop with homology of medicine and food, and tuber is its main product organ. The development mechanism of tubers plays an important guiding role in the breeding related to the improvement of yield and quality of yam. Based on transcriptome sequencing of tubers at different growth stages ($T_1 \sim T_6$), after *de novo* assembly, 42 042 unigenes were obtained and annotated using seven databases. After identification, it was found that a large number of genes were involved in the process of tuber formation, including hormone synthesis-related genes, signal transduction-related genes, and so on. The results of stage specificity analysis showed that the initial stage of tuber formation was a critical period. The results based on the weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) showed that the expression of hormone-related genes was very active in the early and late stages of tuber growth. Absciscic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) were important hormones for the growth and development of yam tubers. The results lay a foundation for further study on the molecular mechanism of tuber enlargement of yam.

Key words: yam; transcriptome sequencing; stage-specific gene; weighted gene co-expression network analysis

参薯山药(*Dioscorea alata*)是薯蓣科薯蓣属药食同源的作物,其地下块茎是参薯山药的主要产品器官^[1],具有高钾、低纤维、高蛋白质、营养丰富等特

点^[2]。参薯山药块茎在发育过程中边膨大边积累养分,关于其块茎形成的分子机制研究较少。随着高通量测序技术的发展,人们可以从分子水平研究植物的动态发育^[3-4],包括激素和次生代谢物形成的分子机制等^[5]。目前,关于地下块茎发育的研究主要集中在马铃薯、甘薯等作物上,且块茎发育与激素密切相关。前人研究发现, *ABR1* 在芥菜块茎中的表达量显著增加,脱落酸(ABA)介导的信号参与了块茎膨大^[6];在马铃薯块茎膨大早期,调控赤霉素(GA)降解的基因

收稿日期: 2021-05-13

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21)

作者简介: 殷剑美(1977-),女,江苏丹阳人,博士,研究员,主要从事药食同源类作物研究。(E-mail) 602604402@qq.com。张铅为共同第一作者。

通讯作者: 张培通, (E-mail) 1196764929@qq.com

表达量上调,GA 含量迅速下降,从而促进块茎膨大^[7]。Sarker 等^[8]认为,茉莉酸(JA)和茉莉酸甲酯(MeJA)在马铃薯块茎形成中起着重要作用。笔者之前对参薯山药块茎不同发育时期激素含量的研究发现,GA 在块茎形成初期的含量较高,可以抑制块茎形成;ABA 和 JA 对块茎膨大具有促进作用^[9]。

本研究以不同生长时期参薯山药块茎为材料进行转录组测序,采用阶段特异性(Stage specific,SS)方法分析块茎发育过程中相关激素基因的表达,构建其基因共表达网络(Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA),以期揭示参薯山药块茎形成的分子调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为米易山药(*Dioscorea alata* L.),引自四川省米易县,属于国家地理标志农产品,于2018年4月26日种植于江苏省农业科学院六合动物科学基地,当年10月24日收获。块茎于9月4日(播种后132 d)开始膨大,分别于块茎膨大的第11 d(9月14日)、21 d(9月24日)、31 d(10月4日)、41 d(10月14日)、51 d(10月24日)取地下块茎,每次取3株混合,用液氮速冻后保存于-70℃冰柜中备用。

1.2 RNA 和 cDNA 文库的制备

采用 TRIzol 法(Invitrogen, USA)进行总 RNA 的提取,用1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否降解及污染,用 Nano 光度计(IMPLEN, USA)检测 RNA 的纯度($OD_{260/280}$),用 Qubit® RNA 试剂盒(Life Technologies, USA)测定 RNA 的浓度,用 RNA Nano 6000 试剂盒(Agilent Technologies, USA)评估 RNA 的完整性。

取 1.5 μg RNA,用 poly-T 寡聚物磁珠纯化 mRNA。利用随机六聚体引物和 M-MuLV 逆转录酶(RNase H)合成第1链 cDNA,用 DNA 聚合酶 I 和 RNase H 合成第2链 cDNA。用 TruSeq PE Cluster Kit v3 cBot HS(Illumina)在 cBot 聚类生成系统上对索引编码样品进行聚类。在 Illumina HiSeq 平台上对文库进行测序,获得大小为 125 bp/150 bp 的双端 reads。

1.3 测序数据质量的评估

对测序所得原始数据进行过滤,去除接头(未知碱基比例>10%,Qphred 值≤20 的碱基数>50%)。

1.4 拼接及功能注释

采用 Grabherr^[10]对 clean reads 进行拼接,获得

unigene,随后进行七大数据库(包括 NR、NT、PFAM、KOG、Swiss-Prot、KEGG、GO)功能的注释,同时基于斯皮尔曼相关系数(Spearman correlation coefficient, SCC)进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)。

1.5 基因表达量的计算和差异基因的筛选

采用基因表达水平估算方法^[11]对 readcount(read 数)进行每百万碱基对测序的每千碱基转录序列片段(fragments)数目(FPKM)估算,计算公式如下:

$$FPKM = \frac{\text{total exon fragments}}{\text{mapped reads} \times \text{exon length}}$$

式中, total exon fragments 表示总外显子片段数, mapped reads 表示定位 read 数(百万); exon length 表示外显子长度(kB)。

以 P 值<0.05 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$ 为阈值筛选差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)。

$$SS(i, j) = 1 - \frac{\text{Max } E_k^i}{E_j^i}, 1 \leq k \leq 6, k \neq j$$

1.6 阶段特异基因的筛选及共表达网络的构建

通过阶段特异性(Stage specific, SS)算法^[12],筛选得分>0.5 的 unigene 作为阶段特异基因。对基因变异系数>0.5 的基因进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)^[13]。

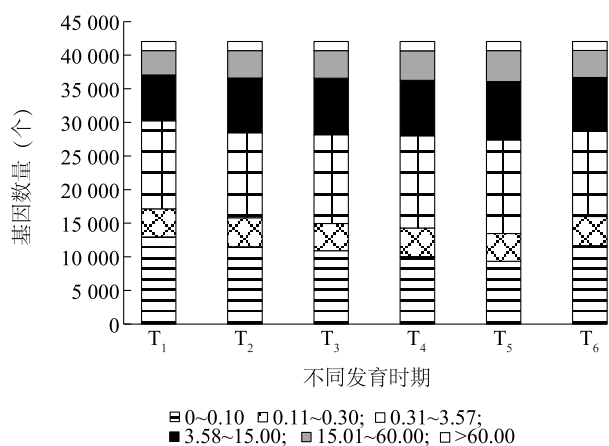
1.7 实时荧光定量 PCR 验证

采用 PrimeScript® 反转录试剂盒(TaKaRa, 大连)合成 cDNA,根据转录组表达量的差异,随机挑选 8 个基因,使用 Primer 5.0(Premier Biosoft International, USA)设计引物,选择 *DaActin* 作为内参基因进行 RT-qPCR。反应程序:95℃ 30 min;95℃ 5 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 45 个循环。通过定量反应的溶解曲线,验证引物的特异性是否满足试验要求。RT-qPCR 反应在 Light Cycle 480 荧光定量 PCR 检测系统(Roche, 瑞士)中进行,依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算基因的相对表达量^[14]。

2 结果与分析

2.1 测序数据分析与基因注释

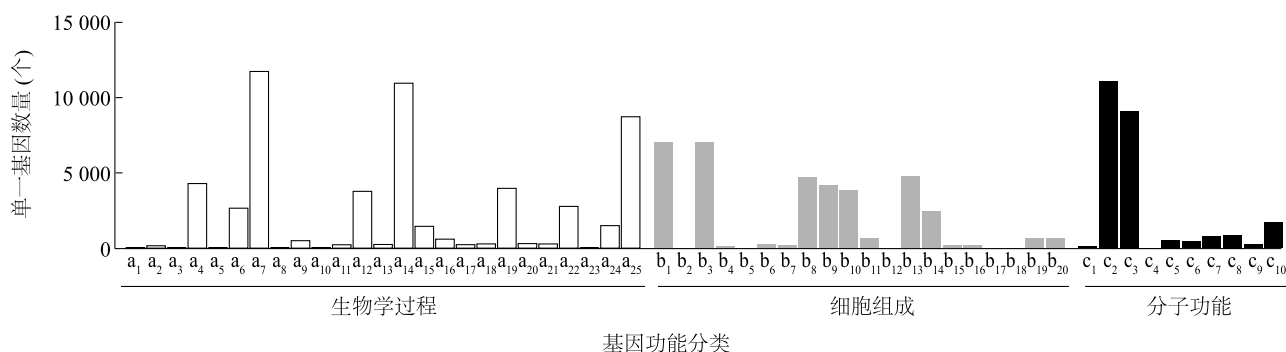
将测序的原始数据过滤后,平均每个文库含有 50 266 758 个 clean reads,共获得 186 793 个 transcripts 和 42 042 个 unigenes。不同 FPKM 区间的 unigene 数量如图 1 所示,可以看出,在不同时期,大部分基因的 FPKM 值为 0~0.10、0.31~3.57。



T₁:块茎膨大第1 d; T₂:块茎膨大的第11 d; T₃:块茎膨大的第21 d; T₄:块茎膨大的第31 d; T₅:块茎膨大的第41 d; T₆:块茎膨大的第51 d。

图1 不同时期基因表达水平的分析

Fig.1 Gene expression levels in different periods



基因功能分类

a₁:行为;a₂:生物黏附;a₃:生物阶段;a₄:生物调控;a₅:细胞死亡;a₆:细胞组成或生源论;a₇:细胞过程;a₈:解毒;a₉:发育过程;a₁₀:生长;a₁₁:免疫系统过程;a₁₂:定位;a₁₃:移动;a₁₄:代谢过程;a₁₅:多组织过程;a₁₆:多细胞组织过程;a₁₇:生物过程负调控;a₁₈:生物过程正调控;a₁₉:生物过程调控;a₂₀:再生;a₂₁:再生过程;a₂₂:刺激响应;a₂₃:节律过程;a₂₄:信号;a₂₅:单一组织过程;b₁:细胞;b₂:细胞交叉;b₃:部分细胞;b₄:细胞外基质;b₅:细胞外基质组成;b₆:细胞外区域;b₇:部分细胞外区域;b₈:大分子复合物;b₉:细胞膜;b₁₀:部分细胞膜;b₁₁:细胞膜闭合腔;b₁₂:类核;b₁₃:细胞器官;b₁₄:部分细胞器官;b₁₅:其他组织;b₁₆:部分其他组织;b₁₇:突触;b₁₈:部分突触;b₁₉:病毒粒子;b₂₀:部分病毒粒子;c₁:抗氧化活性;c₂:结合;c₃:催化活性;c₄:金属伴侣活性;c₅:分子功能调控;c₆:分子转导活性;c₇:核苷酸结合转录因子活性;c₈:结构分子活性;c₉:转录因子活性、蛋白质活性;c₁₀:转运活性。

图2 基因在GO数据库中的注释情况

Fig.2 Gene annotation in GO database

共有10 154个unigenes注释到130个KEGG通路中,可分为新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程和组织系统5类,其中大部分基因注释到新陈代谢的代谢通路中(图3)。

主成分分析结果显示,6个样本可明显分为T₁时期、T₂~T₆时期,T₁时期和其他各时期的相关性较低,T₂~T₆时期较为聚集;块茎在生长早期(T₁时期)和后期(T₂~T₆时期)存在较大差异(图4)。

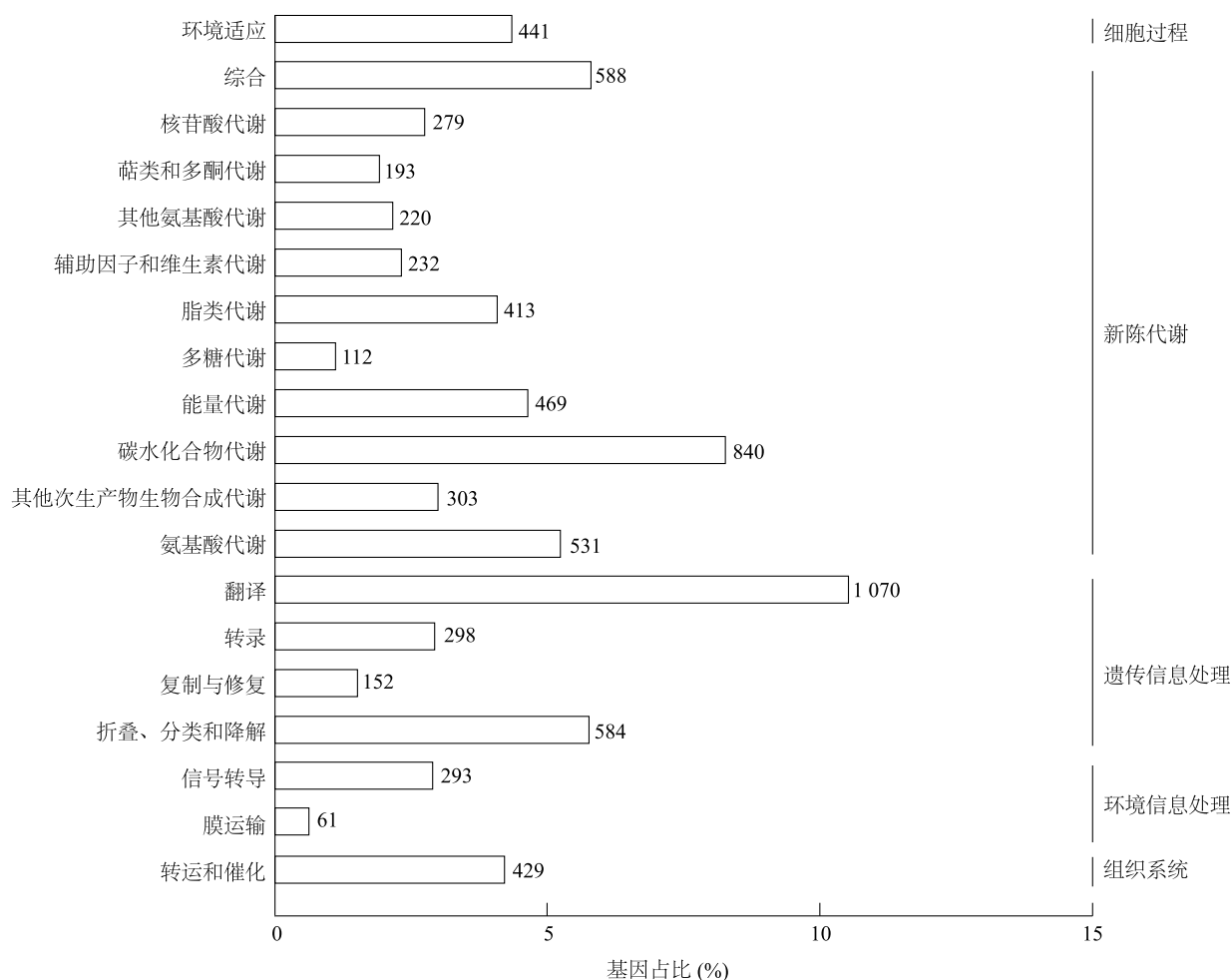
分别有46.48%、24.15%、14.62%、56.74%、35.30%、46.48%和44.01%的基因在GO、KEGG(KO)、KOG、NR、NT、PFAM和SwissProt数据库中得到注释。其中在NR数据库中的注释结果表明,与参薯山药对比率较高的植物是棕榈(23.6%)、海枣(18.7%)、菠萝(7.1%)、小果野蕉(6.8%)和芦笋(5.6%),它们与参薯山药均属于单子叶植物,具有较相似的基因信息。

由图2可以看出,在GO数据库中注释到55个富集条目,其中包括25个“生物学过程”、20个“细胞组成”和10个“分子功能”。“生物学过程”基因主要富集在“细胞过程”(GO:0009987)、“代谢过程”(GO:0008152)和“单一组织过程”(GO:0044699);“细胞组成”基因主要富集在“细胞”(GO:0005623)、“部分细胞”(GO:0044464)和“细胞器官”(GO:0043226);“分子功能”基因主要富集在“结合”(GO:0005488)和“催化活性”(GO:0003824)。

2.2 块茎发育过程中不同表达基因和阶段特异基因分析

分析差异表达基因发现,两两样品之间的DEGs数量为442~6 774个,其中与T₅时期相比,T₁时期的DEGs数量最多,有3 790个上调基因,2 984个下调基因(表1)。共获得8 222个阶段特异表达基因,数量范围为599~3 621个(图5)。GO分析发现,T₁时期的大多数基因与蛋白质磷酸化、去磷酸化、细胞蛋白修饰

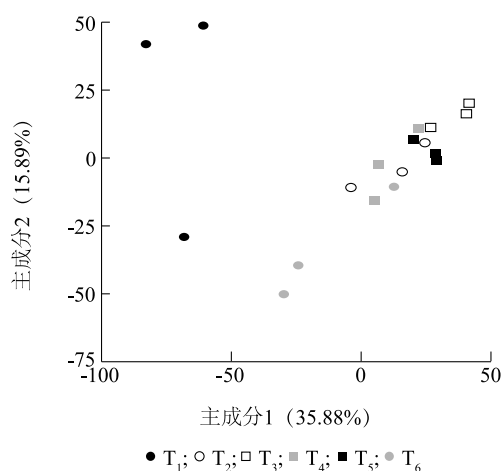
过程、蛋白质修饰过程、生长素应答、脂质转运、激素 应答等有关。



柱旁数据表示注释到相应基因的数量。

图3 不同基因在 KEGG 数据库中的注释情况

Fig.3 Gene annotation in KEGG database



T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 、 T_6 见图1注。

图4 主成分分析示意

Fig.4 Schematic diagram of principal component analysis

2.3 T_1 时期差异表达基因及特异基因分析

主成分分析和不同发育阶段特异基因分析结果显示, T_1 时期和 $T_2 \sim T_6$ 时期之间存在明显差异,在其有表达差异的基因中,共有211个基因编码转录因子,其中36个基因编码AP2/ERF,另外编码WRKY、C2H2、MYB、NAC、bHLH、bZIP的基因均表现为高表达。

通过比较 T_1 时期外的其他时期与 T_1 时期发现,差异表达的基因达9 701个,其中4 546个基因的表达量上调,5 181个基因的表达量下调。GO分析结果显示,上调表达的基因与细胞壁构建、细胞骨架构建、DNA复制、焦磷酸酶活性、染色体、DNA代谢过程调控有关;下调表达的基因与核糖核酸结合、蛋白激酶活性、蛋白激酶磷酸化活性、大分子代谢、初级代谢及

氮化合物过程的调控、细胞大分子和大分子调节及细胞生物合成过程有关。KEGG 分析结果表明,上调表达的基因主要与次生代谢物生物合成、氨基酸合成、代谢和降解、柠檬酸循环有关;下调表达的基因主要

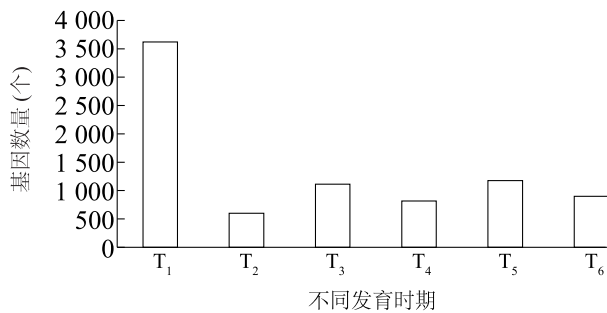
涉及植物激素信号转导、MAPK 信号转导、苯丙氨酸生物合成、酪氨酸生物合成、脂肪酸降解、色氨酸生物合成、玉米素生物合成、生物合成酯类代谢。

表 1 各发育时期的差异表达基因数量

Table 1 Numbers of differentially expressed genes in different developmental stages

发育时期	差异表达的基因数量(个)					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
T ₁	—	3 063+2 356	3 994+3 170	2 874+2 098	3 790+2 984	2 016+1 058
T ₂	2 356+3 063	—	997+1 067	427+468	727+791	1 129+808
T ₃	3 170+3 994	1 067+997	—	940+844	490+373	1 668+1 854
T ₄	2 098+2 874	468+427	844+940	—	171+271	664+362
T ₅	2 984+3 790	791+727	373+490	271+171	—	1 289+1 234
T ₆	1 058+2 016	808+1 129	1 854+1 668	362+664	1 234+1 289	—

T₁、T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 见图 1 注。未加粗的表示上调表达基因,加粗的表示下调表达基因。



T₁、T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 见图 1 注。

图 5 不同时期特异表达基因的数量

Fig.5 Number of specific expressed genes in different periods

2.4 激素相关基因转录谱分析

对所有时期的特异基因进行分析发现,与 GA 相关的 3 个关键基因在整个生长期的表达量均较

低, $0 < FPKM < 7.30$; 与 ABA 相关的 6 个关键基因中的 4 个基因在 T₁ 时期高表达; 与 JA 合成相关的关键基因有 3 个, 其中 2 个的表达水平均在 T₁ 时期最高, 而另 1 个是 T₆ 时期的特异性基因, 在整个块茎形成过程中的表达水平较高 ($160 < FPKM < 2164$)。与 ABA 和 JA 合成相关的关键基因见表 2。

2.5 基因共表达网络的构建

对 20 988 个基因进行共表达网络构建, 可将其分为图 6 中的 25 个不同模块。进一步分析发现, 模块 1 (绿黄模块, 181 个基因) 与 T₁ 时期高度相关, 其中有 18 个编码转录因子, 包括转录因子 BHLH148、WRKY 与乙烯应答相关转录因子 ERF036 like 等。构建 T₁ 时期特征模块基因间联通性的共表达网络, 详见图 7。

表 2 脱落酸和茉莉酸合成相关的关键基因

Table 2 Key genes related to abscisic acid and jasmonic acid synthesis

基因 ID	不同时期差异基因比较	Log ₂ fold change	P 值	基因注释
Cluster-5213.13546	T ₂ 与 T ₁	-1.932 2	1.341 1×10 ⁻³	脱落酸 8 (ABA8) 羟化酶
Cluster-5213.14981	T ₂ 与 T ₁	-6.171 9	2.580 0×10 ⁻⁷	ABA8 羟化酶
Cluster-5213.17159	T ₁	—	—	ABA 受体 PYL
Cluster-5213.20371	T ₂ 与 T ₁	1.795 9	3.296 8×10 ⁻²	ABA 受体 PYL
Cluster-5213.10357	T ₃	—	—	ABA 应答元件结合蛋白
Cluster-5213.7062	T ₆ 与 T ₅	3.340 3	6.010 0×10 ⁻⁴	9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶
Cluster-5213.15137	T ₂ 与 T ₁	-1.531 2	3.002 9×10 ⁻²	12-氧-植物二烯酸还原酶
Cluster-5213.14982	T ₂ 与 T ₁	-2.517 4	3.110 3×10 ⁻⁴	茉莉酸 (JA) 氨基合成酶
Cluster-5213.15182	T ₆ 与 T ₅	1.846 6	7.611 0×10 ⁻³	丙二烯氧化物合成酶

T₁、T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 见图 1 注。

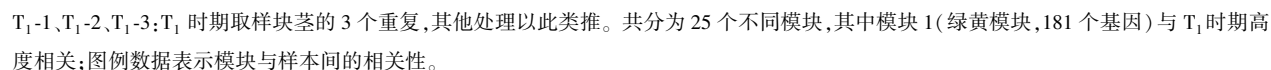


Fig.6 Whole genome co-expression network analysis of vam tubers at different stages

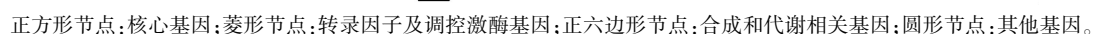


Fig.7 Core gene co-expression network in T₁ stage

2.6 RT-qPCR 验证

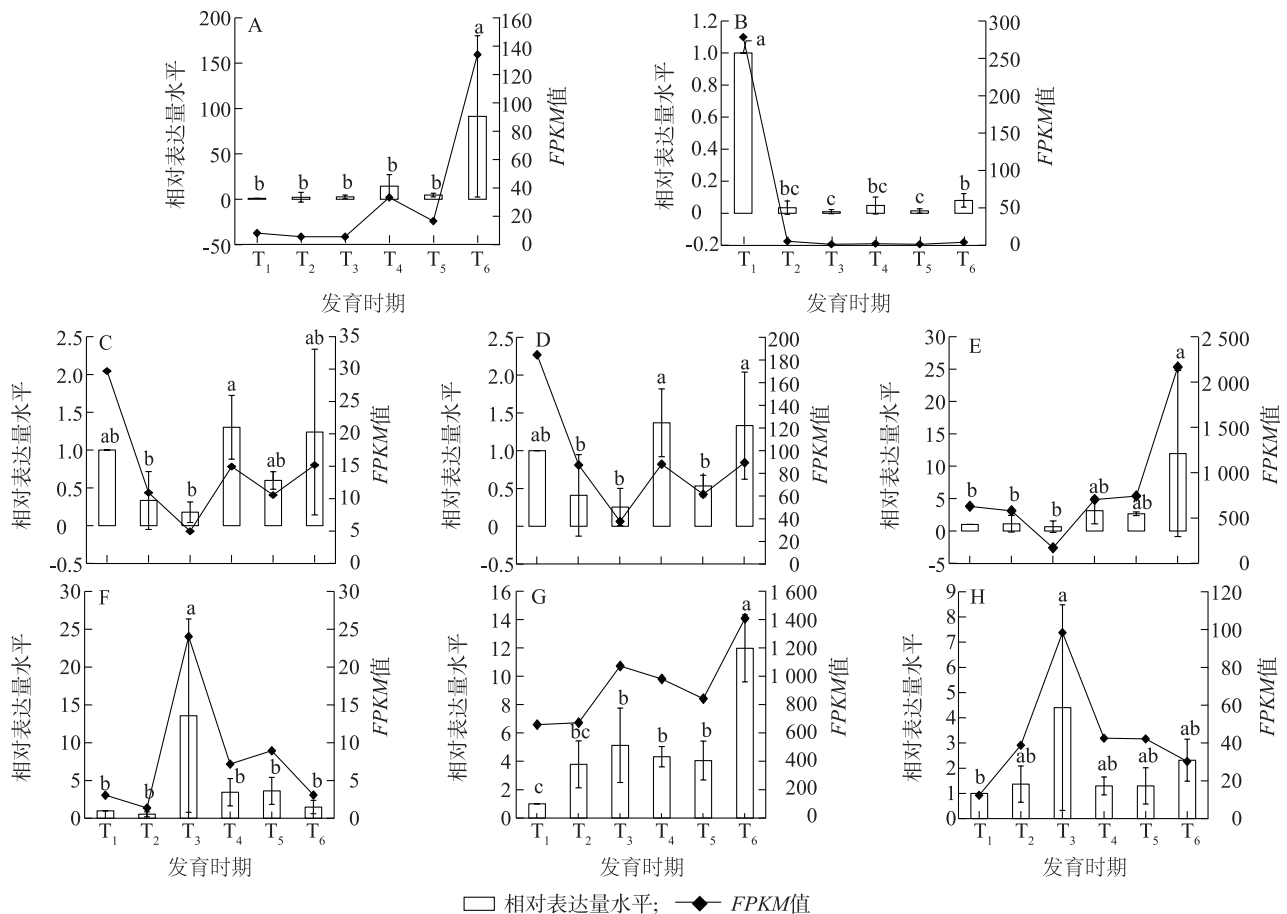
以 *Actin* 为内参基因,随机选取 8 个基因进行 RT-qPCR,测定其表达量。引物序列见表 3,基因表

达量见图 8。基因荧光定量表达趋势与转录组测序结果一致,说明转录组测序结果可靠。

表 3 RT-qPCR 基因引物序列

Table 3 Primer sequence of gene for RT-qPCR

基因名称	正向引物	反向引物
<i>NCED</i>	5'-CCAAACATGAGCGCAACAG-3'	5'-GTCGGCAGTCTTAGGCAACG-3'
<i>CYP707A</i>	5'-TCTCCGAAGCCCAACACCTA-3'	5'-GTGCGAAAGACCGAACTGA-3'
<i>GID1C</i>	5'-CCGAAGACACTCAAACATCCC-3'	5'-AACTGCCGCCGTGAAAGAATA-3'
<i>OPR</i>	5'-ATCGTTGATGCCGTCTTTGAG-3'	5'-GCGGAGATACCCGAGATAGTG-3'
<i>AOS</i>	5'-CGCAGGGCTTCATACCGA-3'	5'-TGGCTGATCCGAAGTTGCA-3'
<i>LOG</i>	5'-TGACAAGCGCTTGATGAGGG-3'	5'-CGTCGTCTCTAGGCACGTATT-3'
<i>GBSS</i>	5'-CCTCATCGGCTTTCAACCCTAA-3'	5'-TCTGGAATGCTCTTGGCTCACA-3'
<i>SSS</i>	5'-GAGGGAACAGCGAGACGAAA-3'	5'-CAGACACTACCGCATCAGC-3'
<i>Actin</i>	5'-AGGCTGGATTGCTGGTGAT-3'	5'-AATGCCATGCTCGATAGGGT-3'



左纵坐标:基于荧光定量法的基因相对表达水平;右纵坐标:基于转录组测序的 FPKM 值。A: *NCED* 基因 (cluster-5213.7062); B: *CYP707A* 基因 (cluster-5213.14981); C: *GID1C* 基因 (cluster-5213.13061); D: *OPR* 基因 (cluster-5213.15137); E: *AOS* 基因 (cluster-5213.15182); F: *LOG* 基因 (cluster-5213.2615); G: *GBSS* 基因 (cluster-5213.17103); H: *SSS* 基因 (cluster-5213.22318)。T₁、T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 见图 1 注。不同发育时期标有不同小写字母的表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

Fig.8 RT-qPCR validation of differentially expressed genes

3 讨论

3.1 山药块茎发育关键时期分析

DEGs 主要发生在块茎形成初期, T_1 时期的特异基因数量最多, 推测块茎形成初期是最重要的阶段, 这与马铃薯相关研究结果^[15]一致。 T_1 时期上调表达的 DEGs 在蛋白质磷酸化、蛋白激酶途径中显著富集, 而蛋白质磷酸化作为细胞信号系统的重要组成部分, 经常参与许多生物过程, 如植物生长发育、细胞分化、刺激反应和抗应激调节^[16]。 T_1 时期的特异基因编码 211 个转录因子, 揭示许多编码 TFs 的基因参与块茎形成。另外 T_1 时期表达的大部分基因与激素有关, 说明激素与块茎形成关系密切。

3.2 参与山药块茎发育过程的激素相关基因分析

植物激素的协同作用对块茎的形成和生长调节具有重要意义。GA 和 ABA 是 1 对经典的植物激素组合, 它们的前体都是甲戊龙酸, 对种子休眠和萌发、根系发育和开花有拮抗作用, GA 和 ABA 之间的平衡和相互调节在植物生长发育中起着重要作用^[17]。关于 GA 对块茎生长的影响有不同观点, 但一般认为, GA 可以抑制或延缓块茎的发育。GA 的信号转导通过环境和内部条件整合 GA 受体 GID1 和抑制因子 DELLA, 形成 GA-GID1-DELLA 三聚体复合体, 从而调节植物的生长发育^[18]。已发现的 DELLA 蛋白包括拟南芥 GAI、RGA、RGL1、RGL2 和 RGL3^[19] 以及小麦 RHT^[20]、大麦 SLN1^[21] 和水稻 SLR1^[22] 等。本研究发现, 编码 DELLA 蛋白的 GAI 在 T_1 时期高表达, 推测块茎开始形成时, GA 就开始受到抑制, 导致 T_2 时期的 GA 含量迅速下降后, 在以后生育期处于较低水平^[9]。

研究发现, *NCED3* 高表达显著增加拟南芥的 ABA 含量^[23]; *ZEP* 参与拟南芥种子发育中 ABA 的合成^[24]; *CYP707A*^[25] 编码 ABA8' 羟化酶。本研究发现, 1 个 *NCED* 基因在 $T_1 \sim T_5$ 时期下调表达, 但在 T_6 期强烈上调表达; 3 个 *ZEP* 基因中有 2 个基因在早期高表达; 3 个 *CYP707A* 基因在 T_1 时期上调表达, 在 $T_2 \sim T_6$ 期的表达量显著降低。在块茎形成过程中, 调控 ABA 的基因的表达一直较活跃, 含量保持上升^[9]。对水稻的研究发现, 高 ABA 含量会诱导淀粉积累量增加^[26], 在山药块茎发育后期 ABA 含量持续增长, 不仅有利于块茎生长, 而且有利于淀粉积累。

丙二烯氧化物合酶(AOS)是 JA 合成途径中的第 1 个特异性酶, 可以催化氧化丙二烯的合成, 12-氧-植物二烯酸还原酶(OPR)是 JA 合成的关键酶, AOS 基因的过度表达可增加马铃薯中 JA 含量^[27]。在本研究中, AOS、OPR 在整个生育期一直高表达, 尤其在 T_1 时期, 推测在山药块茎的整个发育过程中, JA 的合成和代谢相对较强, 使得块茎中的 JA 含量较高^[9]。

共表达网络分析结果显示, 在 T_1 时期的特异性模块中, 乙烯应答转录因子 ERF036 like、真核细胞翻译起始因子等基因的表达水平较高。ERF 转录因子家族参与多种生物过程, 包括激素信号转导、生长发育、代谢及对生物和非生物胁迫的响应^[28-30], 推测在参薯山药块茎发生初期涉及多种激素信号转导过程。在 T_6 时期的特异性模块中, 含有 2 个转录因子(WRKY71、WRKY79)编码基因。在水稻胚、糊粉层细胞中, WRKY71 表达由 ABA 诱导并被 GA 抑制, α -淀粉酶 amy32B 和赤霉素诱导转录激活因子 GAMYB 协同表达^[31]; WRKY79 在玉米中过度表达会增加茉莉酸和乙烯途径、活性氧清除中相关基因及其他相关基因的表达量^[32], 推测在块茎发育后期, 激素相关基因的表达特别活跃。

4 结论

本研究对山药转录组数据的分析发现, 在山药块茎形成初期, 尤其是 T_1 时期为块茎发育的重要时期, 阶段特异基因数目最多, 上调的 DEGs 与细胞生长、激素均密切相关; 块茎发育后期激素相关基因表达特别活跃, ABA 和 JA 是块茎生长发育的重要激素。研究结果与之前关于块茎发育中激素含量的研究结果一致, 转录组测序结合生理测定结果可以为进一步分析山药块茎膨大的分子机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 韦本辉. 中国淮山药栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 2-4.
- [2] OSELEBE H O, OKPORIE E O. Evaluation of water yam (*Dioscorea alata* L.) genotypes for yield and yield components in Abakaliki agro-ecological zone of Nigeria [J]. Agro-Science, 2008, 7(3): 179-185.
- [3] LE B H, CHENG C, BUI A Q, et al. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed specific transcription factors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(18): 8063-8070.
- [4] BELMONTE M F, KIRKBRIDE R C, STONE S L, et al. Compre-

- hensive developmental profiles of gene activity in regions and sub-regions of the *Arabidopsis* seed[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(5): E435-E444.
- [5] ZHOU T, LUO X J, YU C N, et al. Transcriptome analyses provide insights into the expression pattern and sequence similarity of several taxol biosynthesis-related genes in three *Taxus* species[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 33-42.
- [6] SUN Q, ZHOU G F, CAI Y F, et al. Transcriptome analysis of stem development in the tumorous stem mustard *Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee by RNA sequencing[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 53.
- [7] ROUMELIOTIS E, VISSER R G F, BACHEM C W B. A crosstalk of auxin and GA during tuber development[J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(10): 1360-1363.
- [8] SARKER D, PANDEY S K, SHARMA S. Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (*Solanum tuberosum*) tuber formation *in vitro* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 87(3): 285-295.
- [9] 张 铅, 蒋 璐, 张培通, 等. 长江中下游地区参薯块茎发育动态特征分析[J]. 植物生理学报, 2020, 56(12): 2736-2744.
- [10] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29: 644-652.
- [11] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. Nature Protocols, 2012, 7(3): 562-578.
- [12] ZHAN J P, THAKARE D, MA C, et al. RNA sequencing of laser-capture microdissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation[J]. The Plant Cell, 2015, 27(3): 513-531.
- [13] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(1): 559.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] KLOOSTERMAN B, VORST O, HALL R D, et al. Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development [J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3(5): 505-519.
- [16] PAWSON T, SCOTT J D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins [J]. Science, 1997, 278(5346): 2075-2080.
- [17] SHU K, LIU X D, XIE Q, et al. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination [J]. Molecular Plant, 2016, 9(1): 34-45.
- [18] SUN T P. The molecular mechanism and evolution of the review GAGID1-DELLA signaling module in plants[J]. Current Biology, 2011, 21: 338-345.
- [19] TYLER L, THOMAS S G, HU J H, et al. DELLA proteins and gibberellin regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2004, 135: 1008-1019.
- [20] PENG J, RICHARDS D E, HARTLEY N M, et al. 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. Nature, 1999, 400: 256-261.
- [21] FU X D, RICHARDS D E, AIT-AIT T, et al. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor [J]. Plant Cell, 2002, 14(12): 3191-3200.
- [22] IKEDA A, UEGUCHI-TANAKA M, SONODA Y, et al. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8* [J]. Plant Cell, 2001, 13: 999-1010.
- [23] IUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 27(4): 325-333.
- [24] SCHWARZ N, ARMBRUSTER U, LVEN T, et al. Tissue-specific accumulation and regulation of zeaxanthin epoxidase in *Arabidopsis* reflect the multiple functions of the enzyme in plastids [J]. Plant Cell Physiology, 2015, 56(2): 346-357.
- [25] KROCHKO J E, ABRAMS G D, LOEWEN M K, et al. (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase [J]. Plant Physiol, 1998, 118(3): 849-860.
- [26] WANG Z Q, XU Y J, CHEN T T, et al. Abscisic acid and the key enzymes and genes in sucrose-to-starch conversion in rice spikelets in response to soil drying during grain filling [J]. Planta, 2015, 241(5): 1091-1107.
- [27] PAN Z Q, CAMARA B, GARDNER H W, et al. Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide synthase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(17): 18139-18145.
- [28] CAO F Y, DEFALCO T A, MOEDER W, et al. *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR 8 (ERF8) has dual functions in ABA signaling and immunity [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18(1): 211.
- [29] LIU K, LI Y H, CHEN X N, et al. ERF72 interacts with ARF6 and BZR1 to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(16): 3933-3947.
- [30] JIN Y, PAN W Y, ZHENG X F, et al. OsERF101, an ERF family transcription factor, regulates drought stress response in reproductive tissues [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 98(1/2): 51-65.
- [31] XIE Z, ZHANG Z L, ZOU X L, et al. Interactions of two abscisic acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells [J]. The Plant Journal, 2006, 46(2): 231-242.
- [32] FU J Y, LIU Q, WANG C, et al. *Zmwrky79* positively regulates maize phytoalexin biosynthetic gene expression and is involved in stress response [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(3): 497-510.

(责任编辑:徐 艳)