

# 薯蓣茎生珠芽发生相关的转录组和 PEBP 家族基因表达特性分析

孙 玲, 王 月, 陈 阖, 孙小芹, 杭悦宇<sup>①</sup>, 张艳梅<sup>①</sup>

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

**摘要:** 以薯蓣(*Dioscorea polystachya* Turcz.)的具茎生珠芽品种‘铁棍山药’(‘Tiegun’)和无茎生珠芽品种‘花籽山药’(‘Huazi’)为研究对象,采集‘铁棍山药’具茎生珠芽、茎基部无茎生珠芽和茎上部无茎生珠芽的叶腋部位以及‘花籽山药’的叶腋部位4组样品进行转录组测序,并以‘铁棍山药’不同发育期茎生珠芽的叶腋部位为样品进行qRT-PCR分析,以期明确与薯蓣茎生珠芽发生相关的调控基因。结果显示:从2个品种不同部位的4组样品中共获得77 981个All-unigenes,长度主要集中于300~3 000 bp,占总量的99.44%;All-unigenes的平均长度为1 050 bp,N50值为1 764 bp,GC含量为42.66%;转录组unigenes与油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)和海枣(*Phoenix dactylifera* Linn.)的同源性较高。对具茎生珠芽叶腋样品与3组无茎生珠芽叶腋样品的差异unigenes进行功能注释和表达量比较。结果显示:经过GO注释分析,3组转录组分别有6 098、8 840和9 141个差异unigenes注释在细胞组分、分子功能和生物过程3大类43个亚类中,其中,注释在代谢过程亚类的差异unigenes数分别占对应注释unigenes总数的10.6%、10.5%和10.7%;3组转录组分别有11 182、13 552和15 918个差异unigenes注释在KEGG代谢通路,且主要集中在代谢和遗传信息处理;表达量均上调的unigenes有3 531个,表达量均下调的unigenes有1 084个;在具茎生珠芽叶腋部位中特异性表达的unigenes有235个,而在无茎生珠芽叶腋部位中均特异性表达的unigenes仅1个。从转录组中共鉴定出11个PEBP家族成员,且在系统演化树上这些PEBP家族基因主要分布在TFL1-like和FT-like分支上,其中位于TFL1-like分支的Unigene40804\_All与拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.)中已知功能的TFL1基因高度同源,被命名为DpTFL1,且DpTFL1基因仅在‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋部位表达。qRT-PCR分析结果显示:随‘铁棍山药’茎生珠芽发育,DpTFL1基因的表达量逐渐升高,在发育成熟期达到最高。综合分析结果表明:与淀粉合成相关的SUS等基因以及与激素和糖代谢相关的基因可能参与‘铁棍山药’茎生珠芽发育的调控;DpTFL1基因在‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋部位特异性表达,其可能与薯蓣茎生珠芽发生有关。

**关键词:** 薯蓣; 茎生珠芽; 转录组; PEBP 家族基因; TFL1-like; 相对表达量

**中图分类号:** Q786; Q946-33; S632.1    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1674-7895(2021)03-0008-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2021.03.02

**Analyses on transcriptome and PEBP family gene expression characteristics related to stem bulbil genesis of *Dioscorea polystachya*** SUN Ling, WANG Yue, CHEN Min, SUN Xiaoqin, HANG Yueyu<sup>①</sup>, ZHANG Yanmei<sup>①</sup> (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2021, 30(3): 8-19

**Abstract:** Taking cultivar ‘Tiegun’ (with stem bulbils) and ‘Huazi’ (without stem bulbil) of *Dioscorea polystachya* Turcz. as research objects, transcriptome sequencing was performed for 4 groups of samples namely leaf axils of ‘Tiegun’ with stem bulbils, without stem bulbul on base part of stem, and

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 江苏省植物资源研究与利用重点实验室基金项目(SQ201404); 省属公益类科研院所自主科研项目(BM2018021-2)

作者简介: 孙 玲(1995—),女,江西宜春人,硕士研究生,主要从事分子遗传与演化方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: hangyueyu@cnbg.net; zymei628@163.com

引用格式: 孙 玲, 王 月, 陈 阖, 等. 薯蓣茎生珠芽发生相关的转录组和 PEBP 家族基因表达特性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(3): 8-19.

without stem bulbil on upper part of stem, and leaf axils of ‘Huazi’, and qRT-PCR analysis was conducted using the leaf axils of stem bulbils of ‘Tiegun’ at different development stages as samples to clarify the regulation genes related to the stem bulbil genesis of *D. polystachya*. The results show that 77 981 All-unigenes are obtained in total from 4 groups of samples from different parts of 2 cultivars, and their length are mainly concentrated within 300–3 000 bp, accounting for 99.44% of the total amount; the average length of All-unigenes is 1 050 bp, the N50 value is 1 764 bp, and the GC content is 42.66%; the unigenes in transcriptome are highly homologous to *Elaeis guineensis* Jacq. and *Phoenix dactylifera* Linn. Functional annotation and expression comparison were conducted for differential unigenes between leaf axil sample with stem bulbils and 3 groups of leaf axil samples without stem bulbil. The results show that after GO annotation analysis, 6 098, 8 840, and 9 141 differential unigenes in 3 groups of transcriptomes are annotated into 43 subcategories of 3 categories (cellular component, molecular function, and biological process), in which, the number of unigenes annotated in subcategory of metabolic process accounts for 10.6%, 10.5%, and 10.7% of total number of corresponding annotated unigenes, respectively; there are 11 182, 13 552, and 15 918 differential unigenes in 3 groups of transcriptomes annotated in KEGG metabolic pathway, and are mainly concentrated in metabolism and genetic information processing; the number of up-regulated unigenes is 3 531, and that of down-regulated unigenes is 1 084; there are 235 specifically expressed unigenes in leaf axils with stem bulbils, while there is only 1 unigene specifically expressed in all leaf axils without stem bulbil. In total, 11 PEBP family members are identified from transcriptome, and these PEBP family genes are mainly distributed on *TFL1-like* and *FT-like* branches of the phylogenetic tree, in which, Unigene40804\_All located on *TFL1-like* branch is highly homologous to *TFL1* gene (known function) of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., named as *DpTFL1*, and *DpTFL1* gene only expresses in leaf axils of ‘Tiegun’ with stem bulbils. The qRT-PCR analysis result shows that with the development of stem bulbils of ‘Tiegun’, the expression of *DpTFL1* gene gradually increases, and reaches the highest level at mature development stage. The comprehensive analysis result shows that genes related to starch synthesis such as *SUS* and genes related to hormone and carbohydrate metabolism may be involved in regulation of stem bulbil development of ‘Tiegun’; *DpTFL1* gene is specifically expressed in leaf axils of ‘Tiegun’ with stem bulbils, and it may relate to stem bulbil genesis of *D. polystachya*.

**Key words:** *Dioscorea polystachya* Turez.; stem bulbil; transcriptome; PEBP family gene; *TFL1-like*; relative expression

薯蓣属(*Dioscorea* Linn.)为单子叶攀缘植物,其叶腋处常形成一种特殊的侧枝变态器官——茎生珠芽,也称为零余子,是薯蓣属植物重要的无性繁殖器官。薯蓣(*D. polystachya* Turez.)又称山药,是传统的中药和补益食品<sup>[1-2]</sup>,目前主要采用块茎繁殖。在实际生产中,由于薯蓣块茎繁殖过程中往往存在严重的病虫害感染,会导致品种退化,因而,其茎生珠芽常被用于薯蓣品种的复壮<sup>[3-6]</sup>。茎生珠芽与卷须、枝刺等其他侧枝变态类似,均由侧生分生组织发育而来,因此,探讨薯蓣茎生珠芽发生的遗传机制,对薯蓣品种繁育及植物侧枝发育机制探讨均具有重要意义。

在自然界中,除薯蓣外,具珠芽的植物还有龙舌兰(*Agave americana* Linn.)<sup>[7]</sup>、台闽苣苔(*Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Soler.)<sup>[8]</sup>、半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.)<sup>[9]</sup>、淡黄花百合(*Lilium sulphureum* Baker apud Hook. f.)<sup>[10]</sup>和白花虎眼万年青(*Ornithogalum arabicum* Linn.)<sup>[11]</sup>等。目前

关于植物珠芽发生机制的研究主要集中在3个方面:一是光照和温度等环境因子的影响效应<sup>[12-13]</sup>;二是生长素和细胞分裂素等激素的影响效应<sup>[14-15]</sup>;三是遗传基因的调控机制<sup>[7-8,11]</sup>。例如:在龙舌兰花序珠芽的不同发育期,*KNOX 1* 基因在花序珠芽起始处,特别是在分生组织发育的特定部位中有表达<sup>[7]</sup>;台闽苣苔的*GFLO* 基因在其花序和花序珠芽原基中均有特异性表达,且表达量在花序珠芽发生过程中明显下降<sup>[8]</sup>;姜福星等<sup>[11]</sup>筛选出自花虎眼万年青叶面珠芽形成过程中差异表达的关键基因 *EMB* 和 *FKBP* 等。上述这些种类的花序珠芽或叶面珠芽的发生机制与茎生珠芽存在一定的差异。

He 等<sup>[16]</sup>利用转录组测序技术,发现在卷丹(*Lilium tigrinum* Ker Gawler)茎生珠芽的发育过程中,细胞分裂素合成基因 *IPT1/5* 和细胞分裂素激活基因 *LOG1/3/5/7* 的表达量增加,而细胞分裂素降解基因 *CKX4* 的表达量减少,导致其内源性 iPA 型细胞

分裂素的含量增加,并促进了细胞分裂素信号通路基因(*AHK2/3/4*、*AHP1*和*ARR1/2/12*)的表达。Wu等<sup>[17]</sup>通过转录组测序,对参薯(*Dioscorea alata* Linn.)不同发育阶段的茎生珠芽进行了研究,认为生长素、细胞分裂素和脱落酸合成相关基因(*WRKY*、*bHLH*和*MYB*等)以及转录调节因子等均可能参与了参薯茎生珠芽的发育调控。但表达量发生变化,只能说明上述基因或转录调节因子可能参与了珠芽发育过程的调控,并不能直接佐证他们与珠芽的发生有关,因而,目前关于珠芽发生的分子机制仍不明确。

磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)家族的*TFLI-like*基因,主要表达于次级分生组织,包括腋生分生组织、维管形成层和中间分生组织,可抑制茎顶端分生组织形成花原基,目前已知其具有延迟开花、维持茎尖分生组织营养生长、促进侧枝产生等功能<sup>[18]</sup>。例如:过表达*RCN*基因能导致水稻(*Oryza sativa* Linn.)开花延迟,并产生更多分蘖和多穗的圆锥花序<sup>[19]</sup>;过表达*CmTFL1c*基因能导致杭白菊(*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.)的侧枝明显增多、开花延迟,且花形态发生异常<sup>[20]</sup>。qRT-PCR研究结果<sup>[21]</sup>表明:在半夏的茎生珠芽不同发育期,*PteTFL1*基因的表达量存在显著性差异,且随其茎生珠芽的发育,*PteTFL1*基因表达水平先升高后降低,在茎生珠芽刚发生时的表达量最大,暗示*PteTFL1*基因在半夏茎生珠芽的生长发育中可能发挥重要作用。据此,在薯蓣茎生珠芽的发生过程中*TFLI-like*基因是否也具有同样的作用?有待深入探讨。

薯蓣品种‘铁棍山药’(*Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’)和‘花籽山药’(*D. polystachya* ‘Huazi’)的遗传背景极为一致,但前者茎中上部叶腋通常具茎生珠芽,基部叶腋则不具茎生珠芽,属于具茎生珠芽品种;后者茎上不具有珠芽,属于无茎生珠芽品种。作者以上述2个薯蓣品种为实验材料,通过转录组测序,挖掘可能参与调控薯蓣茎生珠芽发生的相关基因,并探究与侧枝发生密切相关的*TFLI-like*基因及其在薯蓣茎生珠芽发生过程中的作用,以期为薯蓣品种繁育及植物侧枝发育机制研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

于2015年6月在徐州市农业科学院实验苗圃选

取长势良好的‘铁棍山药’和‘花籽山药’植株,在‘铁棍山药’的茎上采集具茎生珠芽的叶腋部位(S1)、茎基部无茎生珠芽的叶腋部位(S2)和茎上部无茎生珠芽的叶腋部位(S3)3组样品,在‘花籽山药’的茎上采集叶腋部位(S4)1组样品,用于转录组测序。

在‘铁棍山药’茎上采集不同发育期茎生珠芽的叶腋部位,包括茎生珠芽的未发育期(叶腋部位未见珠芽,T0期)、发育初期(叶腋部位冒出白色小珠芽,T1期)、发育中期(叶腋部位珠芽由白色刚变为棕色,T2期)和发育成熟期(叶腋部位珠芽全变为棕色,T3期)的4组样品,用于*DpTFL1*基因表达量分析。

取样时,使用刀片在叶腋部位割取面积约4 mm<sup>2</sup>的表皮,包含珠芽但不包含维管组织。样品经液氮速冻后于-70℃保存、备用。每个部位或每个时期各采集约10株样株,混合后作为1份样品。

### 1.2 方法

**1.2.1 总RNA的提取及纯化** 将300 mg样品置于液氮中研磨成粉末,用RNA isolater Total RNA Extraction Reagent试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取总RNA;获得的RNA用不含RNase的DNase I(美国Invitrogen公司)于37℃下消化处理30 min,去除DNA污染,然后用Agilent 2100生物分析仪(美国Agilent公司)检测RNA样品的完整性和纯度;最后使用Dynabeads mRNA Purification Kit试剂盒(美国Invitrogen公司)对mRNA进行分离纯化。

**1.2.2 cDNA文库构建** 用Fragmentation Buffer试剂(美国Invitrogen公司)将mRNA随机切割成150~200 nt的片段;以片段化的mRNA为模板,用6碱基随机引物和逆转录酶将mRNA片段反转录成cDNA的第一链,并在RNase H和DNA聚合酶I的作用下合成双链cDNA;对双链cDNA片段进行末端修复及3'末端加‘A’碱基,并在片段两端连接上特定的测序接头;经质量体积分数1.2%琼脂糖凝胶电泳(120 V,20 min)后回收长度约200 bp的cDNA片段,通过PCR扩增富集测序样本。扩增体系总体积25.0 μL,包括20.0 μL金牌Mix(green)(北京擎科新业生物科技有限公司)、10 μmol·L<sup>-1</sup>正向和反向检测引物各2.0 μL以及0.05 ng·μL<sup>-1</sup>cDNA 1.0 μL。扩增程序:98℃预变性2 min;98℃变性10 s、58℃退火10 s、72℃延伸10 s,共30个循环;72℃延伸1 min。并用QIAquick Gel Purification Kit试剂盒(德国Qiagen公司)对PCR产物进行纯化。

**1.2.3 Illumina 测序和 RNA-seq 分析** 构建完成的 cDNA 文库用 Agilent 2100 生物分析仪和 StepOnePlus Real-Time PCR System(美国 ABI 公司)质检合格后, 使用 Illumina HiSeq<sup>TM</sup> 2000 测序平台(美国 Illumina 公司)进行测序, 并将所得的图像数据转化为相应的核苷酸序列数据, 获得原始测序数据。

在原始测序数据中去除接头序列和低质量 reads ( $Q < 20$ ), 获得 clean reads; 使用 Trinity 分析软件 (<https://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) 对获得的高质量序列进行转录组 *de novo* 拼接; 使用 TGICL 软件对拼接的转录组进行聚类去冗余得到 unigenes 序列, 并对各样品的 unigenes 再次进行聚类去冗余得到最终的 unigenes, 命名为“All-unigenes”, 用于后续分析; 对组装的 contigs 和 unigenes 进行长度分布统计。使用 DESeq2 软件对各样品进行差异表达水平分析, 采用 FPKM(每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片)方法<sup>[22]</sup> 进行定量分析, 其中差异 unigenes 的筛选使用表达差异倍数(fold change, FC)的方法, 判断条件为  $| \log_2 \text{FC} | \geq 1 (P \leq 0.05)$ <sup>[23]</sup>。

使用 Blast2GO 软件 (<https://www.blast2go.com>) 将所得的 unigenes 序列与 NR 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) 进行 BLASTx 批量比对 ( $E \leq 10^{-5}$ ), 获取最佳功能注释; 根据 NR 注释信息进行 GO 功能注释, 在获得每个 unigene 的 GO 注释后, 使用 WEGO 软件 (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>) 对所有 unigenes 进行 GO 功能分类统计; 将 BLASTx 所得 unigenes 与 COG 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) 进行比对分析 ( $E < 10^{-5}$ ), 获得基因的 COG 功能注释和 COG 功能分类; 通过 KEGG 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg>) 的注释信息得到 unigenes 的 Pathway 注释; 按 NR、NT、GO、COG、KEGG、SwissProt 和 InterPro 的顺序将 unigenes 序列与以上数据库进行 BLASTx 比对, 翻译后得到该 unigene 编码区的核酸序列(序列方向为 5'→3')和氨基酸序列并预测编码蛋白框(CDS), 没有得到比对结果的 unigenes 则使用 ESTScan 软件预测其编码区。

**1.2.4 PEBP 家族基因的鉴定和表达量分析** 从 Phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 下载拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 和水稻基因组序列和注释信息, 从 Ensemble 数据库 (<ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/>

release-49/fasta/dioscorea\_rotundata/dna/) 下载几内亚薯蓣(*Dioscorea rotundata* Poir.)基因组序列和注释信息。以 PEBP 家族基因中保守的乙醇胺结合域(PF01161)为问询序列, 采用 BLAST 和 HMM(隐马尔科夫模型)方法, 对获得的‘铁棍山药’和‘花籽山药’转录组数据库以及拟南芥、水稻和几内亚薯蓣基因组蛋白序列进行同源性比对( $E$ 值设为 $10^{-4}$ ), 使用 MEGA 7.0 软件中的 ClustalW 对同源序列进行比对, 并使用 PhyML 软件对同源序列进行系统演化树构建<sup>[24-25]</sup>。以 FPKM 值表示转录本丰度, 对具茎生珠芽和无茎生珠芽样本的转录组中全部 PEBP 家族基因的表达量进行分析和比较。

**1.2.5 qRT-PCR 分析** 按前述方法提取‘铁棍山药’不同发育期茎生珠芽叶腋样品的 RNA, 并对 *DpTFL1* 基因表达进行 qRT-PCR 分析。使用 Primer 6.0 软件设计引物, *DpTFL1* 基因正向引物 *qDpTFL1-F* 和反向引物 *qDpTFL1-R* 的序列分别为 5'-GAGGG AGCTGGTGGACTATGAA-3' 和 5'-ATTGAAGAAGAC ACCGGCG-3'; 参照文献[17], 根据薯蓣 *Actin* 基因设计引物, 正向引物 *DpActin-F* 和反向引物 *DpActin-R* 的序列分别为 5'-TGACGAGGATATTCAACCCCT-3' 和 5'-GATAACCCCTTTGGATTGAGC-3'。

采用 ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行 qRT-PCR 分析。扩增体系总体积 20.0  $\mu\text{L}$ , 包括 SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 10.0  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正向和反向引物各 0.8  $\mu\text{L}$  以及 0.05  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20.0  $\mu\text{L}$ 。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。扩增反应结束后进行融解曲线分析, 分析程序: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[26]</sup> 进行基因相对表达量分析。

### 1.3 数据处理和统计分析

使用 SPSS 20.0 软件对‘铁棍山药’不同发育期叶腋样品 *DpTFL1* 基因的相对表达量进行显著性检验(*t*-检验,  $\alpha=0.05$ )。

## 2 结果和分析

### 2.1 转录组测序和 *de novo* 组装结果

‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品中转录组 unigenes 的质量指标见表 1, 2 个品种叶腋部位转

录组 unigenes 的长度分布图见图 1。

结果显示:共获得 77 981 个 All-unigenes, 长度主要集中于 300~3 000 bp, 占总量的 99.44%。All-unigenes 的平均长度为 1 050 bp, N50 值为 1 764 bp, GC 含量为 42.66%。4 组样品的 unigenes 总数、总长度、平均长度、N50 值、N90 值和 GC 含量均有不同程度的差异。

## 2.2 功能注释分析

### 2.2.1 功能注释结果 将获得的 unigenes 序列比对

到 7 大功能数据库, 结果显示: NR 数据库注释了 50 030 个 unigenes, NT 数据库注释了 44 565 个 unigenes, GO 数据库注释了 5 392 个 unigenes, COG 数据库注释了 22 961 个 unigenes, KEGG 数据库注释了 38 681 个 unigenes, SwissProt 数据库注释了 35 872 个 unigenes, InterPro 数据库注释了 38 807 个 unigenes。其中, NR 数据库提供了比其他数据库更多的 unigenes 注释, 大约占 All-unigenes 数的 64.2%。

将‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品的转

表 1 薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品中转录组 unigenes 的质量指标

Table 1 Quality indexes of transcriptome unigenes in different part samples of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ and *D. polystachya* ‘Huazi’

样品 <sup>1)</sup> Sample <sup>1)</sup>	Unigenes 总数 Total number of unigenes	总长度/nt Total length	平均长度/bp Mean length	N50/bp	N90/bp	GC 含量/% GC content
S1	42 856	40 920 119	954	1 482	406	43.41
S2	47 742	44 880 591	940	1 476	394	42.66
S3	53 495	50 062 708	935	1 595	358	43.26
S4	45 602	46 541 852	1 020	1 664	419	42.82
All-unigenes	77 981	81 921 881	1 050	1 764	425	42.66

<sup>1)</sup> S1, S2, S3. 具茎生珠芽的薯蓣品种‘铁棍山药’的叶腋样品 Leaf axil samples from *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ with stem bulbils; S1. 具茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample with stem bulbils; S2. 茎基部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on base part of stem; S3. 茎上部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on upper part of stem. S4. 无茎生珠芽的薯蓣品种‘花籽山药’的叶腋样品 Leaf axil sample from *D. polystachya* ‘Huazi’ without stem bulbil.

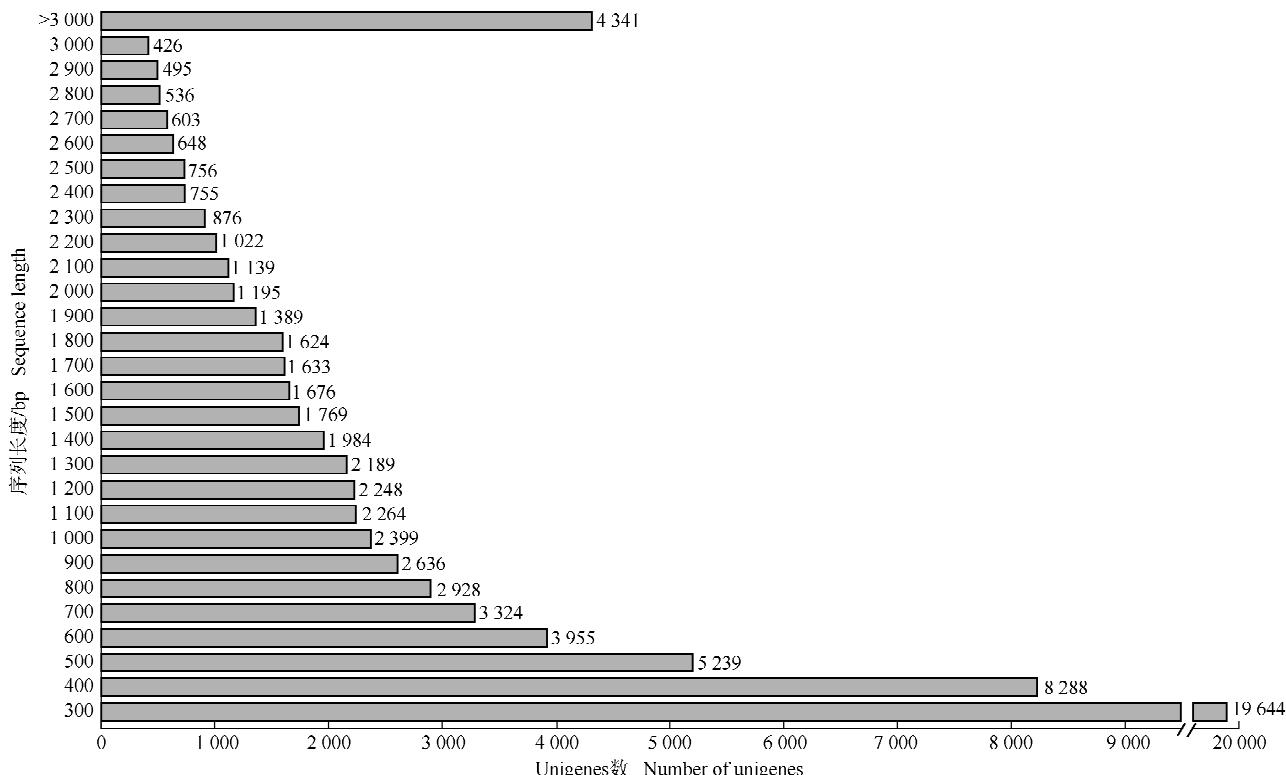


图 1 薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’叶腋部位转录组 unigenes 的长度分布图

Fig. 1 Length distribution diagram of transcriptome unigenes in leaf axils of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ and *D. polystachya* ‘Huazi’

录组 unigenes 与 NR 数据库进行同源序列比对,结果显示:供试 2 个品种的转录组 unigenes 与 4 个种类具有较高的同源性,其中,与油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.) 的同源性最高,有 17 580 个 unigenes 相似,占注释 unigenes 总数的 35.1%;与海枣 (*Phoenix dactylifera* Linn.) 有 12 768 个 unigenes 相似,占注释 unigenes 总数的 25.5%;与小果野蕉 (*Musa acuminata* Colla) 的 1 个亚种 *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* (Ridl.) N. W. Simmonds 有 4 658 个 unigenes 相似,占注释 unigenes 总数的 9.3%;与莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 有 1 556 个 unigenes 相似,占注释 unigenes 总数的 3.1%;与其他种类的 unigenes 相似性较低,占注释 unigenes 总数的 26.9%。从种类的属性看,薯蓣为单子叶植物,与薯蓣转录组注释结果同源性较高的前 3 个种类也同为单子叶植物。

**2.2.2 GO 注释分析** 在 GO 数据库对具茎生珠芽的叶腋样品 (S1) 与无茎生珠芽的叶腋样品 (S2、S3 和 S4) 的转录组 unigenes 功能进行两两比较,结果见图 2。结果显示:分别有 6 098、8 840 和 9 141 个差异 unigenes 注释在细胞组分、分子功能和生物过程 3 大类 43 个亚类中。

在生物过程的 19 个亚类中,3 组差异 unigenes 主要注释在细胞过程、代谢过程和单一生物过程 3 个亚类中。其中,注释在细胞过程的差异 unigenes 分别有 569、844 和 864 个,各占对应注释 unigenes 总数的 9.3%、9.5% 和 9.5%;注释在代谢过程的差异 unigenes 分别有 647、926 和 978 个,各占对应注释 unigenes 总数的 10.6%、10.5% 和 10.7%;注释在单一生物过程的差异 unigenes 分别有 417、575 和 619 个,各占对应注释 unigenes 总数的 6.8%、6.5% 和 6.8%。

在细胞组分的 14 个亚类中,3 组差异 unigenes 主要注释在细胞、细胞部分和细胞器 3 个亚类中。其中,注释在细胞的差异 unigenes 分别有 588、838 和 825 个,各占对应注释 unigenes 总数的 9.6%、9.5% 和 9.0%;注释在细胞部分的差异 unigenes 分别有 588、838 和 825 个,各占对应注释 unigenes 总数的 9.6%、9.5% 和 9.0%;注释在细胞器的差异 unigenes 分别有 470、681 和 653 个,各占对应注释 unigenes 总数的 7.7%、7.7% 和 9.3%。

在分子功能的 10 个亚类中,3 组差异 unigenes 主要注释在 2 个亚类中:一是结合亚类,分别有 538、809 和 786 个差异 unigenes,各占对应注释 unigenes

总数的 8.8%、9.2% 和 8.6%;二是催化活性亚类,分别有 628、849 和 960 个 unigenes,各占对应注释 unigenes 总数的 10.3%、9.6% 和 10.5%。

**2.2.3 KEGG 代谢通路分析** 在 KEGG 数据库中对具茎生珠芽的叶腋样品与无茎生珠芽的叶腋样品的转录组 unigenes 功能进行两两比较,结果见图 3。结果显示:3 组转录组分别有 11 182、13 552 和 15 918 个差异 unigenes 注释在 KEGG 代谢通路,共 5 大类 18 亚类,且主要集中在代谢和遗传信息处理。

注释在代谢相关通路的差异 unigenes 数最多,分别有 7 100、8 265 和 9 882 个,各占对应注释 unigenes 总数的 63.5%、61.0% 和 62.1%,涉及碳水化合物代谢、脂质代谢、氨基酸代谢和其他次生代谢产物的生物合成等 11 个亚类。

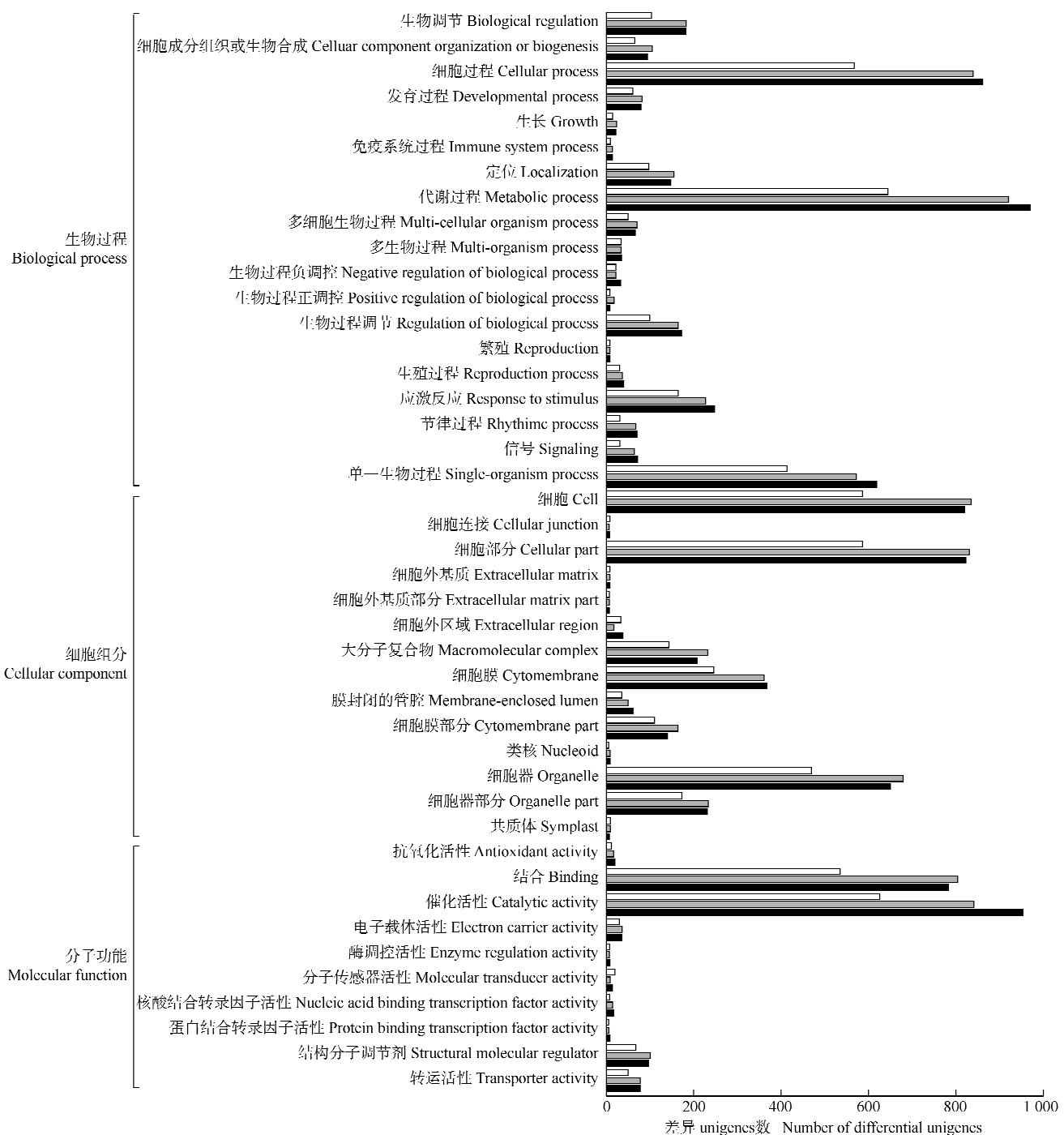
注释在遗传信息处理相关通路的差异 unigenes 分别有 1 969、2 925 和 3 220 个,各占对应注释 unigenes 总数的 17.6%、21.6% 和 20.2%,涉及翻译、转录、复制和修复以及折叠、分类和降解 4 个亚类。

在环境信息处理相关通路中,分别有 459、521 和 612 个差异 unigenes 注释在信号转导亚类,各占对应注释 unigenes 总数的 4.1%、3.8% 和 3.8%。在细胞过程相关通路中,分别有 691、829 和 966 个差异 unigenes 注释在运输和分解代谢亚类,各占对应注释 unigenes 总数的 6.2%、6.1% 和 6.1%。在生物系统相关通路中,分别有 757、816 和 951 个差异 unigenes 注释在环境适应性亚类,各占对应注释 unigenes 总数的 6.8%、6.0% 和 6.0%。

### 2.3 基因表达分析

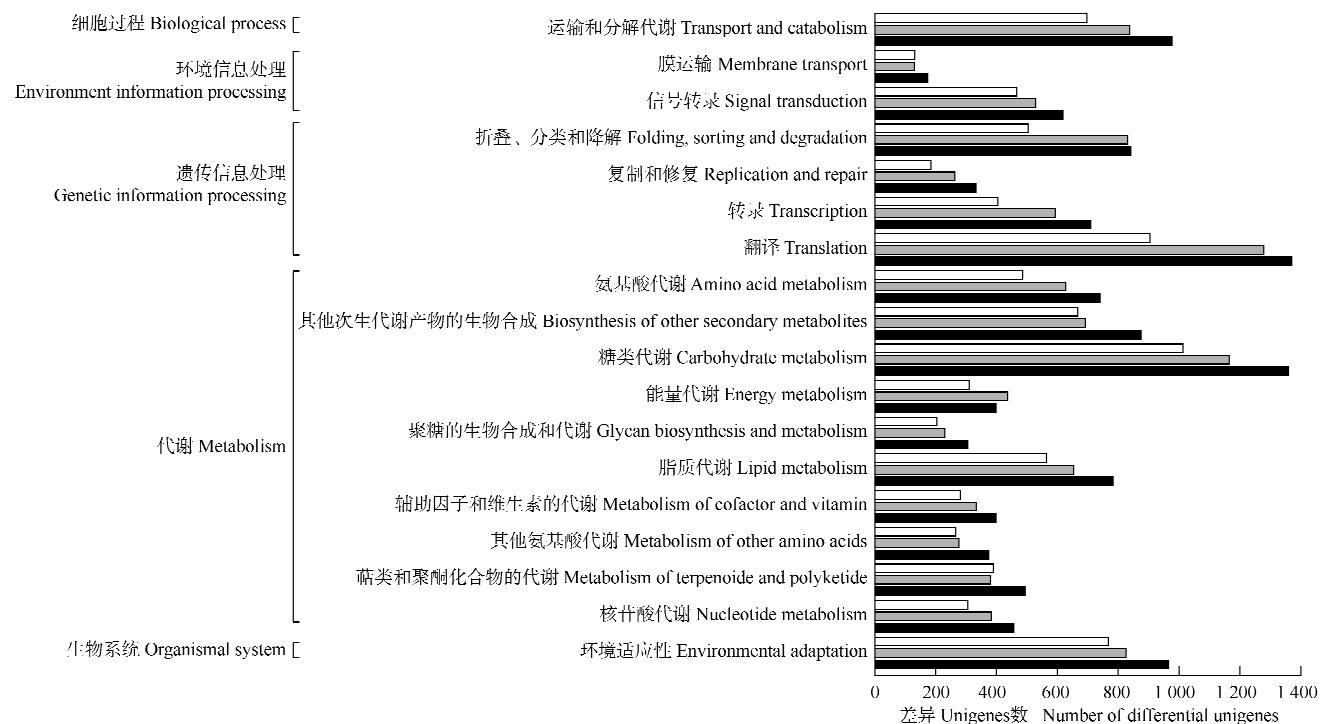
**2.3.1 unigenes 的表达量比较** 对‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋样品 (S1) 与其他 3 个无茎生珠芽的叶腋样品 (S2、S3 和 S4) 的转录组 unigenes 的表达量进行比较,结果显示:与‘花籽山药’的叶腋样品相比,表达量上调和下调的 unigenes 分别有 12 258 和 7 597 个;与茎上部无茎生珠芽的叶腋样品相比,表达量上调和下调的 unigenes 分别有 10 679 和 5 610 个;与茎基部无茎生珠芽的叶腋样品相比,表达量上调和下调的 unigenes 分别有 5 938 和 7 386 个。其中,前两组样品中表达量上调的 unigenes 明显多于表达量下调的 unigenes 数量,前者是后者的 1.6~1.9 倍;而最后一组样品中表达量上调的 unigenes 则少于表达量下调的 unigenes。

将‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋样品与其他



□: 样品 S1 与样品 S2 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S1 and sample S2; □: 样品 S1 与样品 S3 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S2 and sample S3; ■: 样品 S1 与样品 S4 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S1 and sample S4. S1, S2, S3. 具茎生珠芽的薯蓣品种‘铁棍山药’的叶腋样品 Leaf axil samples from *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ with stem bulbil; S1. 具茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample with stem bulbil; S2. 茎基部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on base part of stem; S3. 茎上部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on upper part of stem. S4. 无茎生珠芽的薯蓣品种‘花籽山药’的叶腋样品 Leaf axil sample from *D. polystachya* ‘Huazi’ without stem bulbil.

图 2 薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’叶腋部位转录组差异 unigenes 的 GO 功能分类结果  
Fig. 2 Result of GO function classification of differential unigenes in transcriptome of leaf axes of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ and *D. polystachya* ‘Huazi’



□: 样品 S1 与样品 S2 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S1 and sample S2; ■: 样品 S1 与样品 S3 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S2 and sample S3; ▨: 样品 S1 与样品 S4 的差异 unigenes 富集通路 Enrichment pathway of differential unigenes between sample S1 and sample S4. S1, S2, S3. 具茎生珠芽的薯蓣品种‘铁棍山药’的叶腋样品 Leaf axil samples from *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ with stem bulbils; S1. 具茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample with stem bulbils; S2. 茎基部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on base part of stem; S3. 茎上部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on upper part of stem. S4. 无茎生珠芽的薯蓣品种‘花籽山药’的叶腋样品 Leaf axil sample from *D. polystachya* ‘Huazi’ without stem bulbil.

图3 薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’叶腋部位转录组差异 unigenes 的 KEGG 代谢通路分析结果  
Fig. 3 Result of KEGG metabolic pathway analysis of differential unigenes in transcriptome of leaf axils of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ and *D. polystachya* ‘Huazi’

3 组无茎生珠芽的叶腋样品进行总体比较,结果显示:表达量均上调的 unigenes 有 3 531 个,表达量均下调的 unigenes 有 1 084 个。在具茎生珠芽的叶腋样品中特异性表达的 unigenes 有 235 个,而在 3 组无茎生珠芽的叶腋样品中均特异性表达的 unigenes 仅 1 个。

**2.3.2 PEBP 家族基因的鉴定和表达量分析** 在薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品的转录组数据中共鉴定出 11 个 PEBP 家族成员,将这些 PEBP 家族成员与拟南芥、水稻和几内亚薯蓣的基因组数据进行同源性比对,依次比对出同源基因 6、19 和 11 个。

薯蓣转录组与拟南芥、水稻和几内亚薯蓣基因组中 PEBP 家族成员的系统演化树见图 4。由图 4 可以看出:供试 2 个薯蓣品种的 PEBP 家族基因主要分布在 *TFL1-like* 和 *FT-like* 2 个分支上,其中编号为

Unigene40804\_All 的基因(命名为 *DpTFL1*)与拟南芥中已知功能的 *TFL1* 基因(基因编号为 At5G03840.1)以较高的支持率(88%)聚为一支。

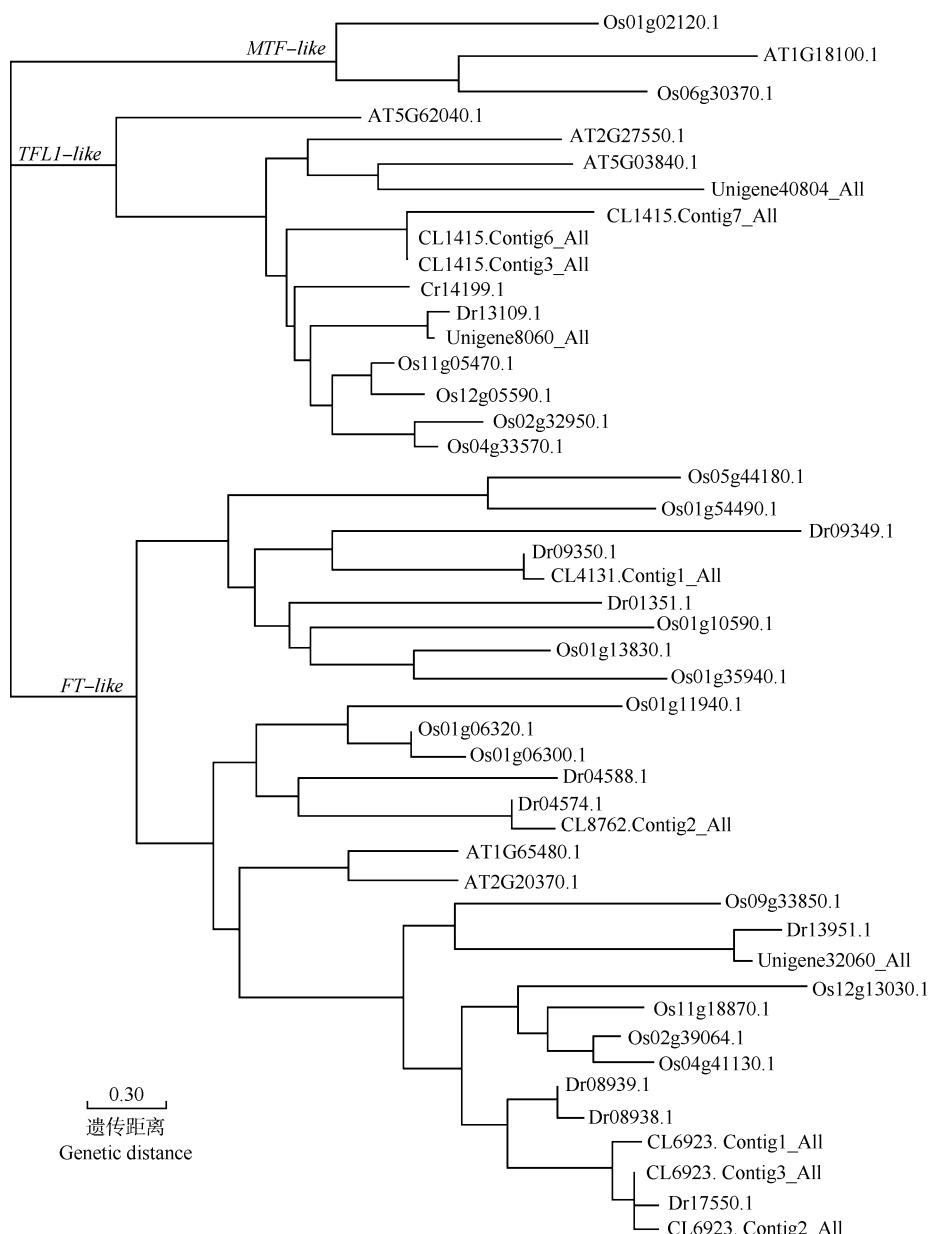
‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品中 PEBP 家族成员的表达丰度见表 2。由表 2 可以看出:分布在 *TFL1-like* 分支的 5 个基因(基因编号分别为 CL1415. Contig6 \_ All、CL1415. Contig3 \_ All、Unigene40804 \_ All、Unigene8060 \_ All 以及 CL1415. Contig7 \_ All)均在‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋样品中表达丰度最高,在其他 3 个无茎生珠芽的叶腋样品中表达丰度均较低。另外,Unigene40804 \_ All(即 *DpTFL1* 基因)只在‘铁棍山药’具茎生珠芽的叶腋样品中特异性表达,推测该基因可能与茎生珠芽的发生有关。

**2.3.3 在茎生珠芽不同发育期 *DpTFL1* 基因的表达量变化** 扩增结果显示:使用 *DpTFL1* 基因的正向引

物 *qDpTFL1-F* 和反向引物 *qDpTFL1-R* 能够扩增出单一条带, 获得的目的片段长度为 187 bp; 使用内参正向引物 *DpActin-F* 和反向引物 *DpActin-R* 也能够扩增出单一条带, 获得的目的片段长度为 190 bp。

采用 qRT-PCR 技术对 *DpTFL1* 基因在‘铁棍山药’茎生珠芽 4 个不同发育期的相对表达量进行分析, 结果(图 5)显示: *DpTFL1* 基因相对表达量在‘铁

棍山药’的茎生珠芽未发育期最低, 但随发育过程推进, *DpTFL1* 基因表达水平逐渐升高, *DpTFL1* 基因的相对表达量在茎生珠芽发育初期、中期和成熟期均显著高于茎生珠芽未发育期; *DpTFL1* 基因的相对表达量在茎生珠芽发育成熟期达到最高, 为茎生珠芽发生初期的 10 倍。表明 *DpTFL1* 基因是薯蓣茎生珠芽特异性表达基因, 且其表达量随珠芽的发育而变化。



Os: 水稻基因组 *Oryza sativa* Linn. genome; AT: 拟南芥基因组 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. genome; Dr: 几内亚薯蓣基因组 *Dioscorea rotundata* Poir. genome; CL, Unigene: 薯蓣转录组 *Dioscorea polystachya* Turcz. transcriptome.

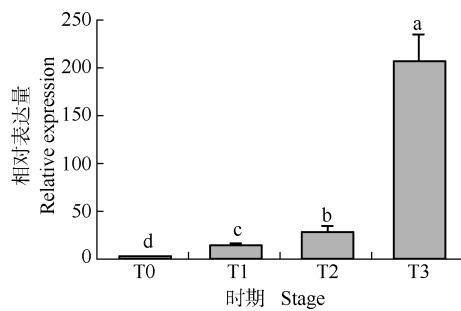
图 4 薯蓣转录组与拟南芥、水稻和几内亚薯蓣基因组中 PEBP 家族成员的系统演化树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of PEBP family members in transcriptome of *Dioscorea polystachya* Turcz. with that in genome of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., *Oryza sativa* Linn. and *Dioscorea rotundata* Poir.

表 2 薯蓣品种‘铁棍山药’和‘花籽山药’不同部位样品中 PEBP 家族成员的表达丰度

Table 2 Expression abundance of PEBP family members in different part samples of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ and *D. polystachya* ‘Huazi’

基因编号 Gene ID	长度/bp Length	在不同部位样品中的表达丰度 <sup>1)</sup> Expression abundance in different part samples <sup>1)</sup>			
		S1	S3	S2	S4
CL1415.Contig6_All	1 005	26.41	3.89	4.75	0.01
CL1415.Contig3_All	1 361	43.90	12.46	5.23	13.02
Unigene40804_All	789	25.14	0.01	0.01	0.01
Unigene8060_All	743	15.43	1.42	3.07	0.53
CL8762.Contig2_All	721	0.53	4.64	0.01	0.22
CL6923.Contig3_All	599	1.19	1.80	2.74	0.01
CL6923.Contig1_All	975	3.94	14.92	3.60	41.71
Unigene32060_All	2 477	0.06	0.32	0.09	4.94
CL4131.Contig1_All	1 196	35.50	475.41	93.56	63.98
CL1415.Contig7_All	1 133	15.86	3.50	2.74	0.01
CL6923.Contig2_All	950	0.48	3.95	0.17	16.78

<sup>1)</sup>S1,S2,S3. 具茎生珠芽的薯蓣品种‘铁棍山药’的叶腋样品 Leaf axil samples from *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’ with stem bulbils; S1. 具茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample with stem bulbils; S2. 茎基部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on base part of stem; S3. 茎上部无茎生珠芽的叶腋样品 Leaf axil sample without stem bulbil on upper part of stem. S4. 无茎生珠芽的薯蓣品种‘花籽山药’的叶腋样品 Leaf axil sample from *D. polystachya* ‘Huazi’ without stem bulbil.



T0: 茎生珠芽未发育期 Undeveloped stage of stem bulbil; T1: 茎生珠芽发育初期 Early development stage of stem bulbil; T2: 茎生珠芽发育中期 Middle development stage of stem bulbil; T3: 茎生珠芽发育成熟期 Mature development stage of stem bulbil.

不同小写字母表示差异显著( $\alpha=0.05$ ) Different lowercases indicate the significant ( $\alpha=0.05$ ) difference.

图 5 薯蓣品种‘铁棍山药’茎生珠芽发育过程中 *DpTFL1* 基因的相对表达量变化

Fig. 5 Change of relative expression of *DpTFL1* gene in stem bulbil development process of *Dioscorea polystachya* ‘Tiegun’

### 3 讨 论

上述研究结果表明:薯蓣品种‘铁棍山药’的具茎生珠芽叶腋部位与其茎上部无茎生珠芽叶腋部位以及无茎生珠芽品种‘花籽山药’的叶腋部位相比,表达量上调的 unigenes 数明显多于表达量下调的 unigenes 数,说明大部分差异 unigenes 在茎生珠芽的起始和形成过程中上调,提示茎生珠芽的启动过程可能需要更多基因的上调表达。前人在白花虎眼万年

青和卷丹的叶面珠芽形成过程中也发现上调 unigenes 数多于下调 unigenes 数<sup>[11,16]</sup>。值得注意的是,Weber 等<sup>[27]</sup>和姜福星等<sup>[28]</sup>的研究结果表明:注释为 *BTB/POZ* 基因的 unigenes 表达量在具叶面茎生珠芽的叶腋部位明显上调,该基因能够调控其下游基因表达,进而促进细胞的增殖、分裂和分化进程。由于在白花虎眼万年青的叶面珠芽发育过程中 *BTB/POZ* 基因的表达量也显著上调<sup>[28]</sup>,因此,该基因可能与启动珠芽发生相关。另外,在‘铁棍山药’的具茎生珠芽叶腋部位显著上调表达的基因还有蔗糖合成酶基因 *SUS*(另文发表),该基因是淀粉合成通路中的重要基因,而淀粉合成在珠芽的起始过程中起重要作用,多糖能够在茎生珠芽细胞的成熟过程中积累并促使茎生珠芽的形成<sup>[6]</sup>,而 *SUS* 基因在卷丹茎生珠芽发育过程中也上调表达<sup>[16]</sup>。因此,推测与淀粉合成相关的 *SUS* 等基因与薯蓣茎生珠芽发生相关。

在‘铁棍山药’的具茎生珠芽叶腋部位,还发现多个与生长素、细胞分裂素和赤霉素等与激素相关的基因表达量明显上调,如生长素生物合成基因 *YUCCA1*、生长素转运蛋白相关基因 *ABCB19* 和 *LAX2* 以及细胞分裂素转运基因 *ENT3* 等(另文发表);这些基因的表达量在参薯的茎生珠芽发育期也显著上调<sup>[17]</sup>;在卷丹的茎生珠芽形成过程中,与赤霉素合成相关的 4 个 *GA2OX* 基因的表达量不同程度上调<sup>[15]</sup>。因此,在‘铁棍山药’的具茎生珠芽叶腋部位中,表达量显著上调的与激素相关基因很可能参与了薯蓣

茎生珠芽发育的调控。

在‘铁棍山药’具茎生珠芽叶腋样品中,特异性表达的 unigenes 数(235)明显多于 3 组无茎生珠芽的叶腋样品(1),提示在茎生珠芽的形成过程中可能需要更多基因在特定部位表达。在‘铁棍山药’具茎生珠芽叶腋部位特异表达的基因中,包含一些与细胞壁修饰相关的基因,如木葡聚糖内糖基转移酶基因 *XET* 和果胶酶基因 *PE* 等,以及 18 个与糖合成和运输有关的基因,如蔗糖转化酶基因 *VIF1* 和海藻糖-磷酸合成酶基因 *TPS* 等(另文发表)。在参薯珠芽发育初期和马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) 块茎发生过程中,这些与细胞壁修饰以及糖合成和运输有关的基因也显著上调表达<sup>[17,29]</sup>;而在‘铁棍山药’和参薯茎生珠芽的发育过程中可溶性糖含量呈曲线上升<sup>[6,17]</sup>。说明这些参与糖代谢的相关基因可能也参与了薯蓣茎生珠芽发育的调控。

在‘铁棍山药’具茎生珠芽叶腋部位特异表达的与侧枝发生相关的 unigenes 中,Unigenes40804\_All 被注释为 PEBP 家族的 *TFL1-like* 同源基因(命名为 *DpTFL1* 基因),其表达丰度最高。*TFL1-like* 基因可能与植物的茎生珠芽发生、侧枝形成和块茎生长相关,如:在杭白菊中 *CmTFL1c* 基因的过表达可导致其侧枝数明显增多<sup>[20]</sup>;在半夏茎生珠芽的生长发育过程中 *PteTFL1* 基因可能发挥重要作用<sup>[21]</sup>;而马铃薯的 *StTFL1* 基因则可通过调控糖代谢途径诱导促进马铃薯块茎的形成<sup>[30]</sup>等。据此推测 *DpTFL1* 基因可能与薯蓣茎生珠芽发育密切相关,这一结论仍需后续实验验证。此外,在 3 组无茎生珠芽的叶腋样品中特异性表达的 1 个 unigene 的表达丰度并不高( $FPKM \leq 1.09$ ),且该基因在 7 大功能数据库中均未被注释为已知功能基因,该基因的功能仍需进一步研究。

研究结果显示:随‘铁棍山药’茎生珠芽发育,*DpTFL1* 基因表达量逐渐升高,并在茎生珠芽发育成熟期达到最高。实际上 *TFL1-like* 基因在不同植物的不同分生组织发育过程中的表达模式存在一定差异,例如:半夏的 *PteTFL1* 基因在半夏茎生珠芽原基形成期表达量高,而在其茎生珠芽原基分化期、膨大期和成熟期表达量则有所减少<sup>[21]</sup>;在白梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) 的花器官发育过程中,*pbTFL1* 基因在花芽分化初期表达量最高,在花启动期明显下降,在花器官原基开始时降至很低,之后表达量不再升高并保持低水平<sup>[31]</sup>;而金鱼草 (*Antirrhinum majus*

Linn.) 的 *CEN* 基因(*TFL1* 同源基因)在花序分生组织中表达量呈现逐渐升高的趋势,且仅在花序发育后期表达量较高,在营养生长期则不表达<sup>[32]</sup>。Goretti 等<sup>[33]</sup>认为,*TFL1-like* 基因编码的蛋白能够通过 14-3-3 蛋白与 bZIP 转录因子 FD 形成复合物,并与特定的染色质结合调控下游基因的表达,如 *LFY* (*LEAFY*)、*API* (*APETALA1*) 以及 *FDL1* (*FD-like 1*) 基因等,从而调控植物的营养生长与生殖生长,并决定分生组织的命运。

此外,*TFL1-like* 基因调控的下游基因也包括与多种激素通路相关的基因,以及与糖合成、运输相关的基因,且与多种激素通路相关联<sup>[34]</sup>。但不同植物在各类分生组织发育过程中相关激素的合成和转运以及糖的合成、运输和储存机制并不相同,导致在不同的植物中 *TFL1-like* 基因表达量的变化规律可能存在异同。本研究仅仅阐明了 *DpTFL1* 基因在‘铁棍山药’茎生珠芽发育过程中的表达模式,但该基因是否调控茎生珠芽的发生及其调控机制还有待进一步的实验研究。

#### 参考文献:

- [1] MARCOS J, CORNET D, BUSSIÈRE F, et al. Water yam (*Dioscorea alata* L.) growth and yield as affected by the planting date: experiment and modelling[J]. European Journal of Agronomy, 2011, 34(4): 247-256.
- [2] BACO M N, BIAOU G, LESCURE J-P. Complementarity between geographical and social patterns in the preservation of yam (*Dioscorea* sp.) diversity in Northern Benin[J]. Economic Botany, 2007, 61(4): 385-393.
- [3] MIGNOUNA H D, NJUKENG P, ABANG M M, et al. Inheritance of resistance to *Yam mosaic virus*, genus *Potyvirus*, in white yam (*Dioscorea rotundata*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(8): 1196-2000.
- [4] COYNE D L, TCHABI A, BAIMEY H, et al. Distribution and prevalence of nematodes (*Scutellonema bradys* and *Meloidogyne* spp.) on marketed yam (*Dioscorea* spp.) in West Africa[J]. Field Crops Research, 2006, 96(1): 142-150.
- [5] OYELANA O A, DURUGBO E U, OLUKANNI O D, et al. Antimicrobial activity of *Ficus* leaf extracts on some fungal and bacterial pathogens of *Dioscorea rotundata* from Southwest Nigeria [J]. Journal of Biological Sciences, 2011, 11(5): 359-366.
- [6] 龙雯虹, 郭华春. 薯蓣零余子的研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(4): 86-89.
- [7] ABRAHAM-JUÁREZ M J, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ A, LEYVA-GONZÁLEZ M A, et al. Class I *KNOX* genes are associated with organogenesis during bulbil formation in *Agave tequilana* [J]. Journal

- of Experimental Botany, 2010, 61(14): 4055–4067.
- [8] WANG C N, MÖLLER M, CRONK Q C B. Altered expression of *GFL0*, the Gesneriaceae homologue of *FLORICAULA/LEAFY*, is associated with the transition to bulbil formation in *Titanotrichum oldhamii* [J]. Development Genes and Evolution, 2004, 214: 122–127.
- [9] 罗 睿, 杜禹珊, 孙莹莹, 等. 半夏珠芽发育过程的形态学和解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2014, 34(9): 1776–1781.
- [10] 李 腾, 李少群, 罗 睿. 淡黄花百合发育过程的形态学与解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 85–89.
- [11] 姜福星, 魏丕伟, 吴 生, 等. 白花虎眼万年青叶上珠芽的转录组分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 519–531.
- [12] 张东华, 汪庆平. 中国魔芋种植业如何应对日本重返缅甸[J]. 热带农业科学, 2015, 35(7): 76–80.
- [13] 宋正达, 朱洪武, 陈梅香. 龙舌兰科八种多肉植物开花结实与珠芽的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2015(8): 177–178.
- [14] 龙雯虹, 王 琼, 肖美丽, 等. 山药珠芽休眠期内源激素含量的变化及多效唑破除休眠的效果[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 1996–2000.
- [15] YANG P, XU L, XU H, et al. Histological and transcriptomic analysis during bulbil formation in *Lilium lancifolium* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1508.
- [16] HE G, YANG P, CAO Y, et al. Cytokinin type-B response regulators promote bulbil initiation in *Lilium lancifolium* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 3320.
- [17] WU Z G, JIANG W, TAO Z M, et al. Morphological and stage-specific transcriptome analyses reveal distinct regulatory programs underlying yam (*Dioscorea alata* L.) bulbil growth [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(6): 1899–1914.
- [18] BANFIELD M J, BARKER J J, PERRY A C, et al. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction [J]. Structure, 1998, 6: 1245–1254.
- [19] NAKAGAWA M, SHIMAMOTO K, KYOZUKA J. Overexpression of *RCN1* and *RCN2*, rice *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS* homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice [J]. The Plant Journal, 2002, 29(6): 743–750.
- [20] GAO Y, GAO Y, WU Z, et al. Characterization of *TEMINAL FLOWER1* homologs *CmTFL1c* gene from *Chrysanthemum morifolium* [J]. Plant Molecular Biology, 2019, 99: 587–601.
- [21] 刘 丹. 半夏珠芽发育相关基因的分离研究[D]. 贵阳: 贵州大学生命科学学院, 2018: 74–79.
- [22] TARAZONA S, GARCIA-ALCALDE F, DOPAZO J, et al. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth[J]. Genome Research, 2011, 21(12): 2213–2223.
- [23] TARAZONA S, GARCIA F, FERRER A, et al. NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases[J]. EMBnet Journal, 2012, 17(B): 18.
- [24] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [25] THOMPSON J D, GIBSON T J, HIGGINS D G. Current protocols in bioinformatics[M]. Hoboken: Wiley Online Library, 2003.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [27] WEBER H, HELLMANN H. *Arabidopsis thaliana* BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family [J]. The FEBS Journal, 2009, 276(22): 6624–6635.
- [28] 姜福星, 杨丽娟, 高素萍, 等. 碰碰香叶片的转录组测序分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(10): 2310–2319.
- [29] PEIVASTEGAN B, HADIZADEH I, NYKYRI J, et al. Effect of wet storage conditions on potato tuber transcriptome, phytohormones and growth [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 262.
- [30] GUO J L, YU C L, FAN C Y, et al. Cloning and characterization of a potato *TFL1* gene involved in tuberization regulation [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 103: 103–109.
- [31] 王 超. 梨成花相关基因 *LFY*、*TFL1* 和 *FT* 的克隆表达与成花调控机制研究[D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2013: 31–36.
- [32] BANFIELD M J, BRADY R L. The structure of *Antirrhinum* centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 297: 1159–1170.
- [33] GORETTI D, SILVESTRE M, COLLANI S, et al. TERMINAL FLOWER1 functions as a mobile transcriptional cofactor in the shoot apical meristem [J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2081–2095.
- [34] ZHU Y, KLASFELD S, WAGNER D. Molecular regulation of plant developmental transitions and plant architecture via PEPB family proteins: an update on mechanism of action [J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(7): 2301–2311.

(责任编辑: 郭严冬)