

基于转录组测序的浙贝母鳞茎发育分析及 CKXs 功能验证

董莉莉¹, 徐志浩^{1,2}, 宋 炜¹, 王颖雅¹, 李 青¹, 王忠华^{1,3*}

1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

3. 浙江万里学院现代农学院, 浙江 宁波 315100

摘要: 目的 探知浙贝母 *Fritillaria thunbergii* (“浙贝 1 号”与“浙贝 3 号”) 2 个品种鳞茎形成与发育产生差异的分子机制, 对“浙贝 1 号”与“浙贝 3 号”进行转录组测序, 挖掘导致差异形成的关键基因。方法 以“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”成熟期鳞茎为材料, 采用 Illumina HiSeq 高通量测序平台进行转录组测序, 组装与注释后进行差异基因的富集并筛选与鳞茎发育相关的基因, 对获得的候选基因进行功能验证。结果 转录组测序后共获得 35 509 个 Unigene 注释信息, 其中差异表达基因共 295 个。对京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因本体论 (gene ontology, GO)、同源蛋白簇 (clusters of orthologous groups of proteins, KOG) 富集结果进行筛选, 获得了 132 个与鳞茎形成及发育相关的候选基因, 涉及淀粉合成、蛋白质合成、植物激素及信号转导。淀粉合成相关基因与鳞茎膨大相关。淀粉与蛋白质的合成可能是新鳞茎形成的物质基础。与赤霉素 (gibberellin, GA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、细胞分裂素 (cytokinin, CTK) 和吲哚乙酸 (indole acetic acid, IAA) 相关 DEGs 可能是浙贝 3 号鳞茎繁殖系数提高的原因。通过浙贝母鳞茎内源激素与质量的相关性分析, 发现“浙贝 1 号”与“浙贝 3 号”鳞茎中 CTK 与质量呈极显著正相关。对筛选出的 *CKX3* 和 *CKX9* 进行生物信息学分析, 结果显示 2 个基因都符合细胞分裂素脱氢酶的基本特征。在本氏烟草上进行瞬时过表达及亚细胞定位实验, 结果显示 *CKX3* 和 *CKX9* 表达量提高且能降低 CTK 的含量, GFP 信号定位在细胞膜上。结论 通过对“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组测序, 初步揭示了导致繁殖系数及形态特征产生差异的候选基因, 并对 *CKX3* 和 *CKX9* 进行了功能验证, 可为浙贝母鳞茎发育研究提供科学依据。

关键词: 浙贝母; 转录组; 鳞茎发育; 细胞分裂素脱氢酶; 赤霉素; 脱落酸; 吲哚乙酸

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8538-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.021

Analysis of bulb development of *Fritillaria thunbergii* based on transcriptome sequencing and gene function verification of CKXs

DONG Lili¹, XU Zhihao^{1,2}, SONG Wei¹, WANG Yingya¹, LI Qing¹, WANG Zhonghua^{1,3}

1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

2. College of Advanced Agricultural Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. College of Fisheries and Life Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

Abstract: Objective To elucidate the molecular mechanisms underlying the differences in bulb formation and development between the two varieties of *Fritillaria thunbergii* (“Zhebei No. 1” and “Zhebei No. 3”), transcriptome sequencing was performed on both varieties, with a focus on identifying key genes associated with these differences. **Methods** The mature bulbs of Zhebei No.1 and Zhebei No.3 were used as materials for transcriptome sequencing by Illumina HiSeq high-throughput sequencing platform. After assembly and annotation, differential genes were enriched and genes related to bulb formation and development were screened, and the functions of the obtained candidate genes were verified. **Results** A total of 35 509 Unigene annotation messages were obtained after transcriptome sequencing, including 295 differentially expressed genes. The results of KEGG, GO and KOG enrichment were screened, and 132 candidate genes related to bulb formation and development were obtained, including starch synthesis, protein

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 浙江省中药材新品种选育重大科技专项 (2021C02074-1); 宁波市重点研发计划暨“揭榜挂帅”项目 (2023Z120); 宁波市特色农产品质量安全检测与控制重点实验室开放项目 (KF202302)

作者简介: 董莉莉 (1997—), 女, 硕士。E-mail: 2869135817@qq.com

*通信作者: 王忠华 (1972—), 男, 博士, 教授。E-mail: wang1972@zww.edu.cn

synthesis, plant hormones and signal transduction. Genes related to starch synthesis were associated with bulb enlargement. The synthesis of starch and protein may be the material basis for the formation of new bulbs. DEGs related to GA, ABA, CTK and IAA may be the reason for the increase of reproductive coefficient of Zhebei No.3 bulb. Through the correlation analysis of endogenous hormones and quality in bulb, it was found that CTK in the bulbs of Zhebei No.1 and Zhebei No.3 is extremely significantly positively correlated with quality. The selected *CKX3* and *CKX9* genes were analyzed by bioinformatics, and the results showed that the both were consistent with the basic characteristics of cytokinin dehydrogenase. Transient overexpression and subcellular localization were carried out on *Nicotiana benthamiana*, and the results showed that *CKX3* and *CKX9* expression levels were increased and CTK content was decreased, and GFP signal was localized on the cell membrane. **Conclusion** By sequencing the transcriptome of Zhebei No.1 and Zhebei No.3, the candidate genes that lead to the differences in reproductive coefficient and morphological characteristics were initially revealed, and the functions of *CKX3* and *CKX9* were verified, which can provide basis for the study of bulb development of *F. thunbergii*.

Key words: *Fritillaria thunbergii* Miq.; transcriptome; the development of bulb; cytokinin dehydrogenase; gibberellin; abscisic acid; indole acetic acid

浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 为百合科贝母属多年生草本植物^[1], 鳞茎经切片后干燥处理作药材“浙贝母”。经过系统选育^[1-2], 已有“浙贝 1 号(浙认药 2007001)”和“浙贝 3 号(浙认药 2018002)”新品种。浙贝 1 号鳞茎繁殖系数为 1:1.9, 表皮金黄或黄色, 呈扁圆形, 鳞片抱合度松; 浙贝 3 号鳞茎繁殖系数为 1:2.61, 表皮乳白色, 呈宝塔形, 鳞片抱合度紧^[2]。浙贝母主要药用成分为浙贝甲素及浙贝乙素, 具有镇咳祛痰、镇痛抗菌、解毒散结消痈等功能^[3]。现代药理研究表明^[4], 浙贝母在抗炎、抗肿瘤、抗氧化和神经保护等方面也有一定作用。

“浙贝 3 号”繁殖系数及产量相较于“浙贝 1 号”有明显提高, 但与其他中药材相比仍有不小差距。作为一种历史悠久的大宗药材, 浙贝母鳞茎形成及发育机制是目前亟需解决的科学问题。浙贝母鳞茎形成及发育是多因素作用的复杂调控过程, 受蔗糖代谢、淀粉合成及内源激素等相关因素的影响。浙贝母干燥鳞茎中淀粉含量最高, 占总重的 66.53%~74.15%^[5]。3~5 月鳞茎中淀粉含量逐渐上升, 而蔗糖与可溶性糖呈下降-上升-下降趋势, 蔗糖与可溶性糖上升的时期可能是淀粉积累的主要阶段^[6]。可以看出, 淀粉合成和蔗糖代谢是浙贝母鳞茎发育的重要因素。赤霉素 (gibberellin, GA) 和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 也与浙贝母鳞茎发育密切相关, 浙贝母中 GA 对鳞茎质量呈负调控, 而 ABA 呈正调控^[7]。GA 对百合科植物鳞茎形成同时存在促进和抑制 2 种现象^[8-9], 而低浓度的吲哚乙酸 (indole acetic acid, IAA) 有利于鳞茎数量的提高^[10]。在亚洲杂交百合的研究中, 发现施加 *N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲 [*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea,

CPPU] 和 2-异戊烯基腺嘌呤 (2-isopentenyladenine, 2-iP) 后, 鳞片的基底区域细胞分裂素 (cytokinin, CTK) 增加并且促进了小鳞茎的形成^[11]。但是蔗糖代谢、淀粉合成、内源激素等因素对浙贝母鳞茎形成及发育作用机制尚不明确。利用 RNA-Seq 技术, 选择“浙贝 1 号”及“浙贝 3 号”成熟期鳞茎进行转录组测序, 对浙贝母鳞茎形成及发育的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 进行筛选, 从转录水平阐释 2 个品种间产生差异的原因, 可以为探究鳞茎形成及发育的分子机制提供数据基础。

1 材料

本研究以成熟期植株形态标准、生长状况良好的“浙贝 1 号”(A1~A3) 和“浙贝 3 号”(B1~B3) 为转录组测序材料 (图 1)。所有样品取自浙江省宁波市海曙区章水镇浙贝母产业园基地, 经浙江万里学院王忠华教授鉴定为浙贝母 *F. thunbergii* Miq., 确定所选样品为“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”。

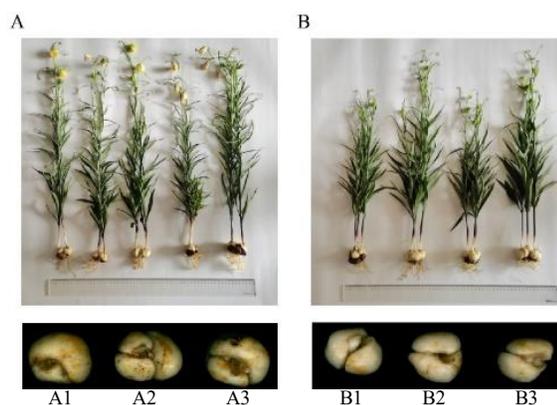


图 1 “浙贝 1 号” (A) 和 “浙贝 3 号” (B)
Fig. 1 Zhebei No.1 (A) and Zhebei No.3 (B)

每种样品设定 3 个生物学重复。样品选用鳞茎部分，鳞茎去除心芽、鳞茎盘后用液氮速冻，并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。以成熟期“浙贝 3 号”和“浙贝 1 号”鳞茎为材料测定 DEGs 表达量。以幼苗期、开花初期、盛花期、始枯期和成熟期“浙贝 3 号”和“浙贝 1 号”鳞茎为材料测定鳞茎质量、CTK、ABA、GA 及 IAA 含量并进行相关性分析。

2 方法

2.1 cDNA 文库构建及高通量测序

使用 FastPure[®] Universal Plant Total RNA Isolation kit (Vazyme Biotech 有限公司) 分别提取总 RNA，使用 NanoPhotometer 分光光度计检测 RNA 浓度及纯度，使用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性。样品经检测合格后进行文库构建，使用 Agilent 2100 生物分析仪和 CFX96 实时 PCR 系统对文库进行质检。质检合格后，委托武汉迈维代谢生物科技有限公司在 Illumina 平台上进行测序并完成序列数据处理。

2.2 基因功能注释

使用 DIAMOND^[12]程序将转录组 Unigene 序列与 KEGG、NR、Swiss-Prot、GO、COG/KOG、TrEMBL 数据库进行 BLASTX ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$) 比对，预测完 Unigene 氨基酸序列后使用 HMMER ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-4}$) 软件与 Pfam 数据库比对，获得 Unigene 注释信息。

2.3 差异表达基因筛选及聚类分析

本研究使用 DESeq^[13-14]进行组间差异表达分析。采用 FPKM 作为衡量 DEGs 表达量的指标，以错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 为筛选标准获得 DEGs。使用 TBtools^[15]软件进行 DEGs 聚类分析并绘制热图。使用 R 语言进行 Kmeans 聚类分析。

2.4 qRT-PCR

使用 FastPure[®] Universal Plant Total RNA Isolation kit 分别提取总 RNA，质量经检测符合要求后，利用 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) Kit (Novoprotein Scientific Inc. 有限公司) 获取 cDNA，Primer 6.0 软件设计引物。qRT-PCR 实验采用 $2 \times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix kit (Vazyme Biotech 有限公司)，具体操作按说明书进行。以 Ft Actin^[16]为内参基因，每个样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

2.5 候选基因筛选与功能验证

对筛选出的 DEGs 进行分析，获取与鳞茎形成与发育相关的候选基因。根据转录组中 CDS 序列设计引物并以 $2 \times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (Vazyme Biotech 有限公司) 进行基因克隆。选择实验室保藏的 35S-3 \times FLAG-1300 载体，设计引物并以 NovoRec[®] plus One step PCR Cloning Kit (Novoprotein Scientific 有限公司) 通过同源重组法构建基因过表达载体。选择 pGWB505-eGFP 载体，设计引物并以 Gateway 法构建亚细胞定位载体。载体构建完成后，转入 DH5 α 感受态中，于相应抗性培养基上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑选单菌落并进行菌落 PCR 及测序。将测序正确的载体转入农杆菌感受态中，于相应抗性培养基上 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑选单菌落并进行菌落 PCR。配制侵染液并对本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 进行注射瞬时侵染，暗培养 2 d，光照培养 1 d。提取 DNA 用于 PCR 阳性鉴定。提取 RNA 用于候选基因表达量的测定。于共聚焦显微镜下观察 GFP 信号，判断候选基因表达位点。

通过 Expasy、SOPMA、TMHMM2.0、NCBI、Plant-Ploc、AlphaFold 等^[17-18]在线网站或软件对候选基因进行生物信息学分析。按照上海科兴植物细胞分裂素 ELISA 试剂盒要求提取细胞分裂素并进行含量测定。

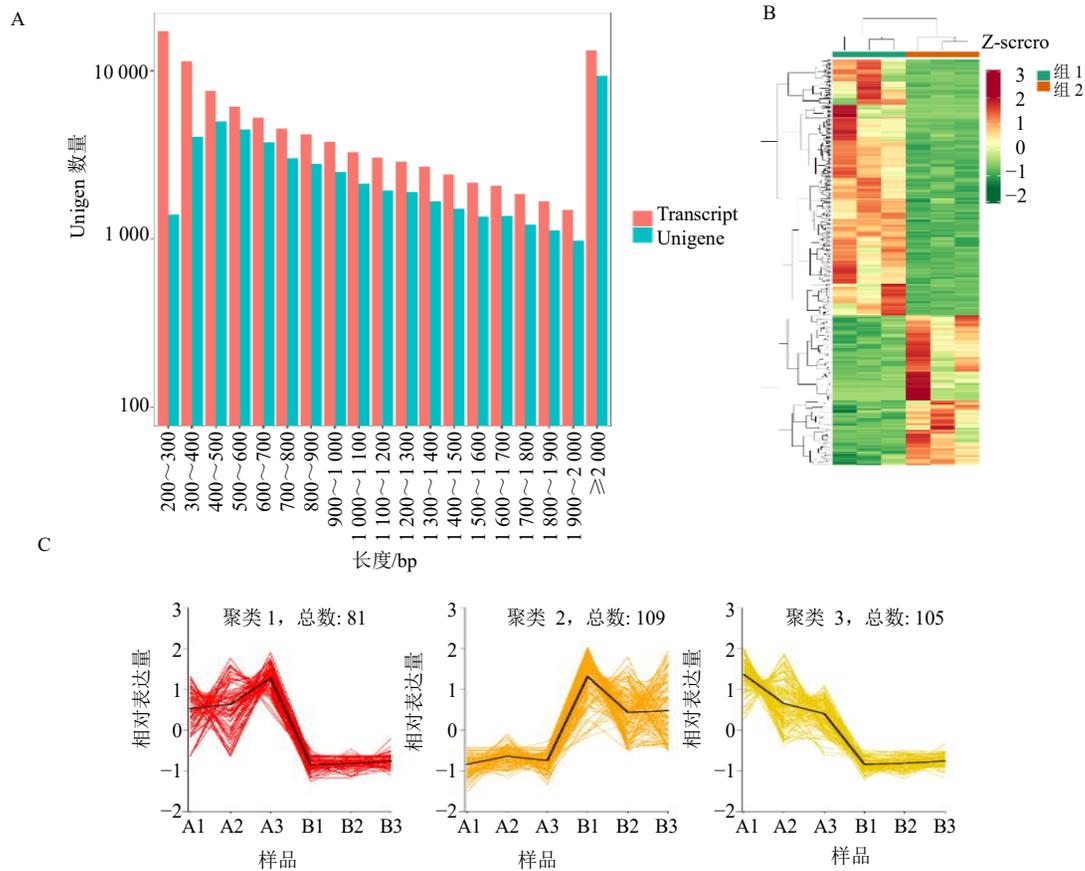
3 结果与分析

3.1 转录组测序结果统计

对“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组测序原始数据经过滤后， Q_{20} 均在 97% 以上， Q_{30} 均在 92% 以上，GC 含量均接近 50%，这表明数据准确可用于后续组装及分析。组装获得 51 586 个 Unigene，总长度为 66 381 842 bp，平均长度 1 287 bp， N_{50} 长度为 1 770 bp。这些 Unigenes 中 24 555 个 (47.60%) 大于 1 000 bp，10 452 个 (20.26%) 小于 500 bp (图 2-A)。

3.2 差异表达基因的功能注释和聚类分析

3.2.1 差异表达基因的功能注释 将组装获得的 Unigenes 与 7 个公共蛋白质/核苷酸数据库进行了 BLAST 比对进行功能注释。最终获得 35 509 个 (68.83%) 有注释信息的 Unigene。其中 26 138 个 (50.67%) 在 KEGG 中得到注释，34 885 个 (67.62%) 在 Nr 数据库中得到注释，26 976 (52.29%) 在 SwissProt 中得到注释，34 805 个 (67.47%) 在 TrEMBL 中得到注释，20 258 个 (39.27%) 在 KOG 中得到注释，30 130 个 (58.41%) 在 GO 中得到注



A-转录组中 Unigene 在不同长度的分布情况；B-“浙贝 1 号”（A1、A2、A3）与“浙贝 3 号”（B1、B2、B3）转录组中 DEGs 聚类热图，红色表示基因表达上调，绿色表示基因表达下调；C-DEGs 的 Kmeans 聚类图。

A-Unigene length distribution of the transcriptome; B-DEGs clustering heat maps in the transcriptome of Zhebei 1 (A1, A2, A3) and Zhebei 3 (B1, B2, B3), red indicates the up-regulated gene expression, green indicates the down-regulated gene expression; C-Kmeans cluster diagram of DEGs.

图 2 所有 Unigene 长度分布及差异基因聚类分析

Fig. 2 Unigene length distribution and DEGs cluster analysis

释，24 732 个（47.94%）在 Pfam 中得到注释。

对“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组中的 DEGs 进行筛选，共获得 295 个 DEGs，其中表达量下调的有 186 个，上调的有 109 个（图 2-B）。采用 Kmeans 聚类对 DEGs 进行分类（图 2-C），共鉴定出 3 个具有不同表达模式的聚类，其中聚类 1 和聚类 3 在“浙贝 1 号”中高表达，聚类 2 在“浙贝 3 号”中高表达。聚类 1 中主要为糖类及脂类物质合成代谢的 DEGs，涉及果糖和甘露糖代谢（fructose and mannose metabolism）、脂肪酸延伸（fatty acid elongation）、脂肪酸代谢（fatty acid metabolism）等途径。聚类 2 包含了各类转移酶、脱氢酶、水解酶、激酶、锌指蛋白、转录因子 MYB 及信号识别受体等功能蛋白质合成代谢的 DEGs，涉及精氨酸生物合成（arginine biosynthesis）、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成（phenylalanine, tyrosine and

tryptophan biosynthesis）、肌醇磷酸代谢（inositol phosphate metabolism）、氮代谢（nitrogen metabolism）、ABC 转运蛋白（ABC transporters）等途径。聚类 3 包含了蛋白质翻译相关的 DEGs，涉及氨酰生物合成（aminoacyl-tRNA biosynthesis）、嘧啶代谢（pyrimidine metabolism）、核质运输（nucleocytoplasmic transport）、核苷酸代谢（nucleotide metabolism）、核糖体（ribosome）等途径。3 个聚类中同时具有植物激素信号转导（plant hormone signal transduction）、MAPK 信号通路（MAPK signaling pathway-plant）、丙酮酸代谢（pyruvate metabolism）等途径中的 DEGs。

3.2.2 差异表达基因 KEGG 通路聚类分析 在 KEGG 代谢通路中共获得了 98 个 DEGs 的注释（图 3），主要分为细胞过程（cellular processes）、环境信息处理（environmental information processes）、遗

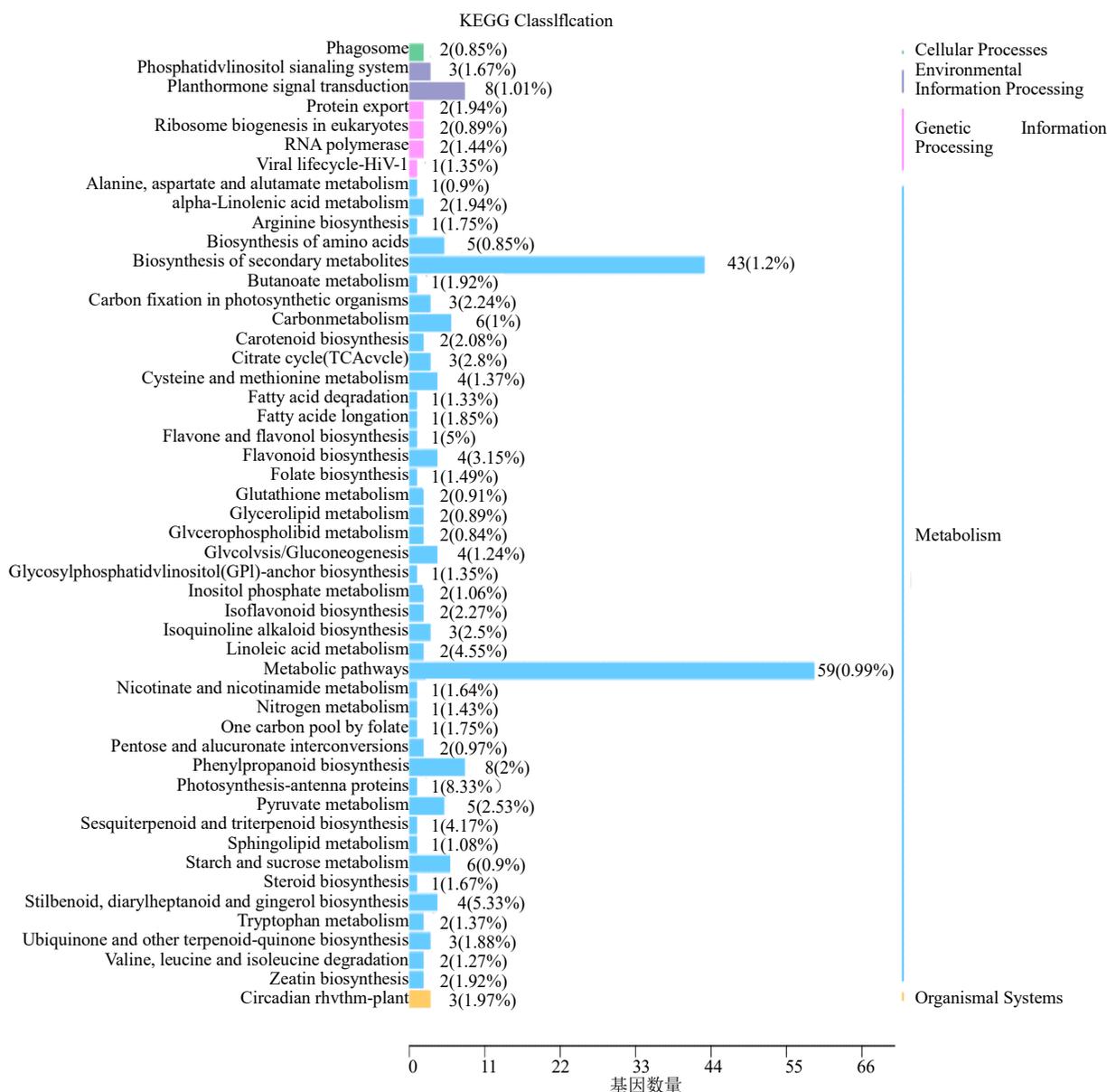


图 3 “浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组 DEGs 的 KEGG 分析

Fig. 3 KEGG clustering of DEGs in transcriptome Zhebei No.1 and Zhebei No.3

传信息过程 (genetic information processes)、新陈代谢 (metabolism)、有机系统 (organismal systems) 5 个部分, 包括苯丙酸生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction)、碳代谢 (carbon metabolism)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、三羧酸循环 (citrate cycle)、糖酵解 / 糖原异生 (glycolysis/ gluconeogenesis)、萜类骨架生物合成 (terpenoid backbone biosynthesis) 及类胡萝卜素生物合成 (carotenoid biosynthesis) 等合成代谢通路。

3.2.3 差异表达基因 GO 聚类分析 在 GO 分类数据库中, 211 个 DEGs 获得了注释并被分类到分子

功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 和生物学过程 (biological process, BP) 3 大分类 (图 4)。在 MF 中 176 个 DEGs 获得注释并分为了 3 小类, 且在结合 (binding) 和催化活性 (catalytic activity) 中基因数量较多; 在 CC 中 161 个 DEGs 获得注释并分为了 2 小类, 且大部分 DEGs 富集于细胞结构单元 (cellular anatomical entity) 分类中。在 BP 中 170 个 DEGs 获得注释并分为了 13 小类, 且在细胞过程 (cellular process) 和代谢过程 (metabolic process) 中富集到了较多的基因。在富集到较多 DEGs 的小类中, 下调基因的数量远高于上调基因。

3.2.4 差异表达基因 KOG 聚类分析 在 KOG 数据库

中，根据蛋白序列的同源性对 DEGs 进行聚类，一共获得了 126 个 DEGs 的注释，分为了 23 个 KOG 类别（图 5）。一般功能预测基因（general

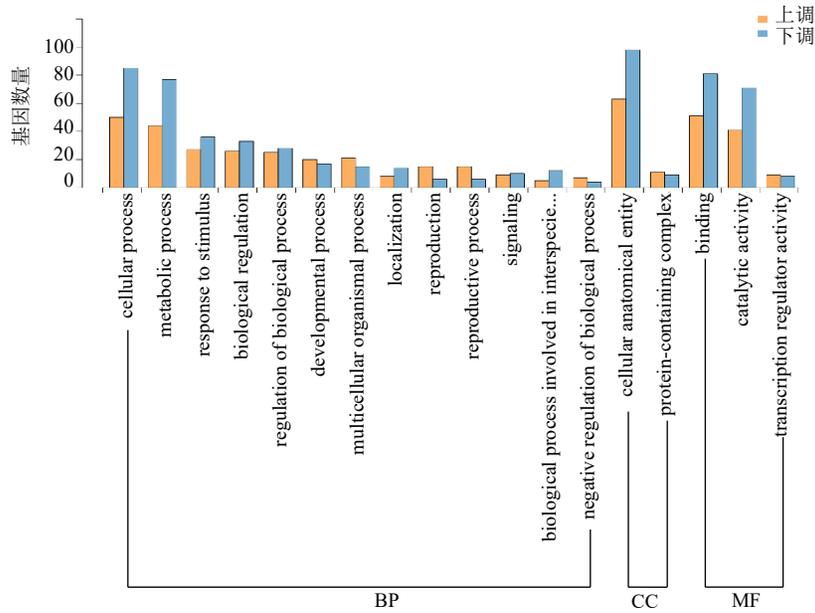


图 4 “浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组 DEGs 的 GO 分析

Fig. 4 GO clustering of DEGs in transcriptome Zhebei No.1 and Zhebei No.3

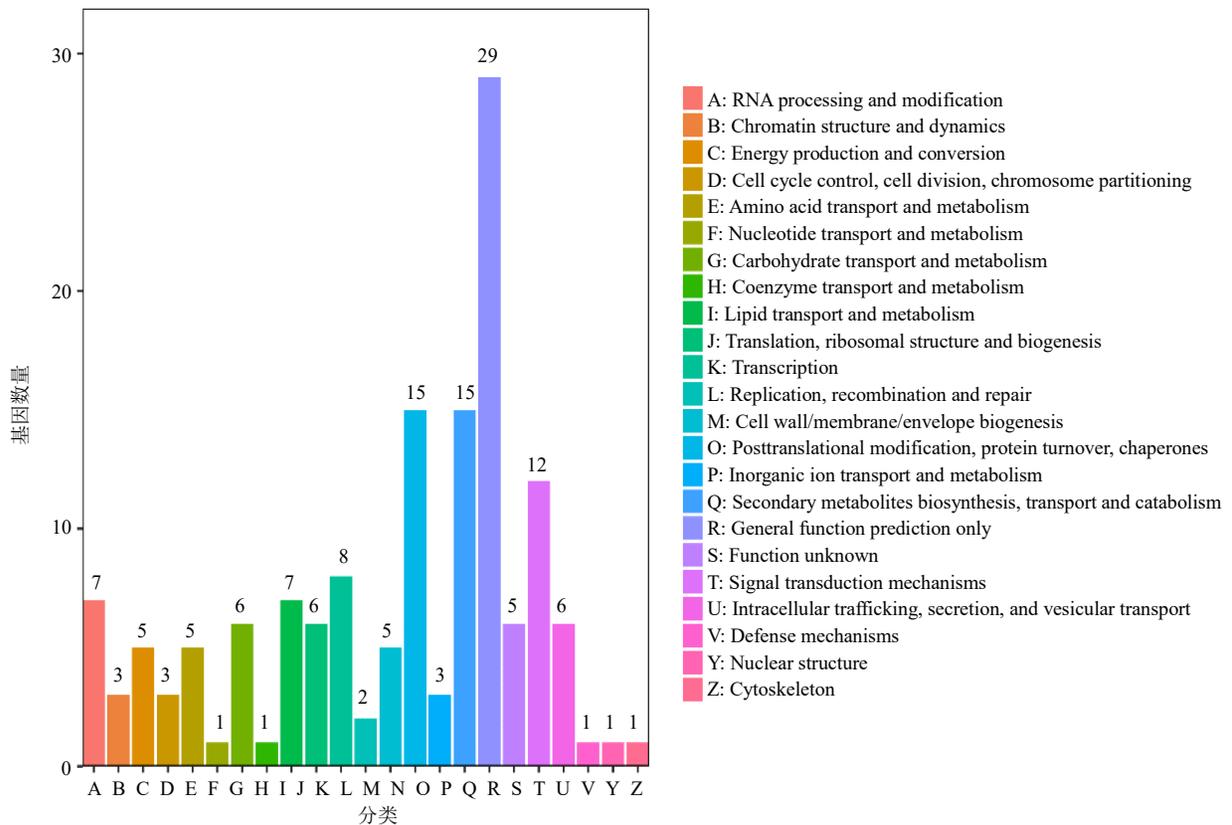


图 5 “浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”转录组 DEGs 的 KOG 分析

Fig. 5 KOG clustering of DEGs in transcriptome Zhebei No.1 and Zhebei No.3

function prediction only)、翻译后修饰、蛋白转运和蛋白伴侣 (posttranslational modification, protein turnover, chaperones)、次生代谢生物合成、转运和分解代谢 (secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism) 及信号转导机制 (signal transduction mechanisms) 4 个类别中包含较多的 DEGs。相比之下, 防御机制 (defense mechanisms)、核酸结构 (nuclear structure)、细胞骨架 (cytoskeleton)、核酸转运和代谢 (nucleotide transport and metabolism)、辅酶转运和代谢 (coenzyme transport and metabolism) 5 个类别中包

含的 DEGs 最少。

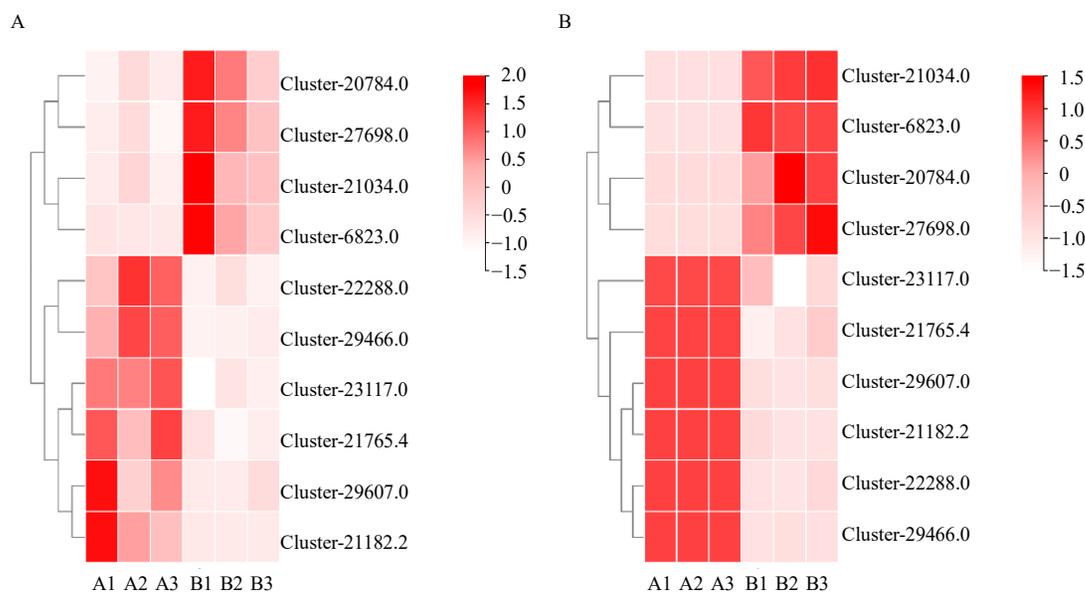
3.3 qRT-PCR 验证 DEGs 表达情况

为了验证转录组数据的准确性, 选择 10 个筛选出来的高表达基因进行 qRT-PCR 验证, 每个基因进行 3 次生物学重复, 序列见表 1。结果发现, 这些 DEGs 在“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”中的表达趋势与转录组分析结果基本一致 (图 6), 这说明本实验不同品种浙贝母成熟期鳞茎转录组测序数据真实可靠, 可以用来挖掘浙贝母鳞茎发育过程中的关键基因。

表 1 转录组数据验证引物序列

Table 1 Primer used in transcriptome data validation

| 基因 ID | 基因代号 | 上游引物 (5'→3') | 下游引物 (5'→3') |
|-----------------|---------|----------------------|----------------------|
| Cluster-20784.0 | BRI1 | AGGGCCAGATTCTCCTCAT | CGAGAAGTCTCCCTTCGT |
| Cluster-27698.0 | SnRK2 | GAATATGCCTCTGGCGGTGA | ATTTTAAGGCGAGGTGCCGT |
| Cluster-21034.0 | ABA | TATTGGCGAAAGCATCAC | AAAGAGGCGTAGAGGTCA |
| Cluster-6823.0 | GGPS | GCCGAAGACAATAGCTCCGT | CGTCATCAGCTCGACACCAT |
| Cluster-22288.0 | SIMKK | CAAGGAGCAGGAGGGTGT | CCGCTACGAGTCGCAGAA |
| Cluster-29466.0 | TGA | GGAGCGGTAGCGGATAGGA | CGCCGCAATCAAGAAATG |
| Cluster-23117.0 | ARF | GATGTCCAGAGCAAGCCTCA | TCGGAGACATCAGTTCACCC |
| Cluster-21765.4 | CKX9 | GGGTCAGTTCGGAATCAT | TTGGTCCTCTGTAAAGTTGG |
| Cluster-29607.0 | AUX/IAA | TCTTAGGAGCACACTCGCTG | GCGGTCCGAAACATGAGAGA |
| Cluster-21182.2 | CYP707A | TCACTTGGGCTGATACACG | AACACTTTCATCCCTTTG |
| | β-Actin | CATAATCCAGAGCCACATA | TGCCAATCTACGAGGGTT |



A-转录组数据聚类热图; B-相对表达量聚类热图。

A-transcriptome clustering heat map; B-relative expression level clustering heat map.

图 6 转录组数据验证

Fig. 6 Validation of transcriptome data

3.4 候选基因筛选

为了挖掘与浙贝母鳞茎形成与发育相关的 DEGs, 对 KEGG、GO 及 KOG 中富集的 DEGs 进行筛选。从 KEGG 富集结果中筛选出了 40 个与浙

贝母生长发育相关的通路, 共计 60 个 DEGs (表 2)。这些 DEGs 可以分为糖代谢、脂类物质合成代谢、蛋白质合成代谢、萜类物质合成代谢及激素信号转导 4 类。

表 2 KEGG 富集结果中与植物生长发育相关的 20 个代表性基因

Table 2 20 representative genes related to plant growth and development in KEGG enrichment results

| KEGG 图谱 | KEGG_途径 | 基因 ID | KEGG 注释 |
|---------|----------------|------------------|--------------------|
| ko00020 | 柠檬酸循环 (TCA 循环) | Cluster-14575.0 | 甘露聚糖内切-1,4-β-甘露糖苷酶 |
| ko00051 | 果糖和甘露糖代谢 | Cluster-22156.12 | 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 |
| ko00500 | 淀粉和蔗糖代谢 | Cluster-29342.1 | 二氢叶酸还原酶/胸苷酸合酶 |
| ko00600 | 鞘脂类代谢 | Cluster-21240.2 | 二氢神经酰胺酶 |
| ko01212 | 脂肪酸代谢 | Cluster-31537.2 | 棕榈酰蛋白硫酯酶 1 |
| ko00900 | 萜类骨架生物合成 | Cluster-6823.0 | 香叶基香叶基二磷酸合酶 II 型 |
| ko00909 | 倍半萜类和三萜类生物合成 | Cluster-11727.0 | 瓦伦西亚烯氧化酶 |
| ko00950 | 异喹啉生物碱的生物合成 | Cluster-21427.1 | 去甲乌药碱合酶 |
| | | Cluster-16503.2 | 诺贝拉定-O-甲基转移酶 |
| ko00940 | 苯丙素类生物合成 | Cluster-29754.4 | 肉桂醇脱氢酶 |
| ko00908 | 玉米素生物合成 | Cluster-21765.4 | 细胞分裂素脱氢酶 |
| | | Cluster-26092.0 | 细胞分裂素脱氢酶 |
| ko00906 | 类胡萝卜素生物合成 | Cluster-21034.0 | 黄质醛脱氢酶 |
| | | Cluster-21182.2 | (+)-脱落酸-8'-羟化酶 |
| | | Cluster-20784.0 | 油菜素内酯受体蛋白 1 |
| ko04075 | 植物激素信号转导 | Cluster-29466.0 | 转录因子 TGA |
| | | Cluster-29607.0 | 生长素响应蛋白 IAA |
| | | Cluster-27115.0 | 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 |
| ko00380 | 色氨酸代谢 | Cluster-27115.0 | 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 |
| ko00220 | 精氨酸生物合成 | Cluster-23374.1 | 鸟氨酸氨基甲酰转移酶 |
| ko00250 | 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 | Cluster-26786.0 | 天冬酰胺合成酶 (谷氨酰胺水解) |

从 GO 富集结果的生物过程分类中筛选出了 94 个与浙贝母生长发育相关的 DEGs, 这些 DEGs 主要与植物内源激素、激素信号转导、衰老、糖代谢、蛋白质合成代谢等生命过程有关 (表 3)。

从 KOG 结果中筛选出了 53 个与浙贝母生长发育相关的基因, 共分为 15 个 KOG 类别。其中次生代谢物的生物合成、运输和分解分解分类 DEGs 最多, 其次为信号转导机制和一般功能预测 (表 4)。

KEGG、GO、KOG 共富集到了 132 个与浙贝母鳞茎形成与发育相关的候选基因 (图 7)。其中 18 个 DEGs 为共同富集到的候选基因 (表 5), 这些候选基因与内源激素、激素信号转导、蛋白质合成及糖代谢相关。

3.5 候选基因功能验证

3.5.1 浙贝母鳞茎质量及内源及素相关性分析
对“浙贝 1 号”及“浙贝 3 号”鳞茎发育过程中内源激素与质量进行相关性分析。结果显示, GA 与质中呈显著负相关; IAA 与质量都为弱相关且不具显著

表 3 GO 富集结果中与植物生长发育相关的 20 个代表性基因

Table 3 20 representative genes related to plant growth and development in GO enrichment results

| 基因 ID | 生物过程注释 |
|------------------|---------------------------------|
| Cluster-21765.4 | 调节激素水平 |
| Cluster-26092.0 | 调节激素水平 |
| Cluster-8057.29 | 细胞分裂素激活的信号通路 |
| Cluster-8662.0 | 脱落酸激活信号通路的正向调控 |
| Cluster-14759.2 | 脱落酸激活信号通路的负向调控 |
| Cluster-16985.0 | 乙烯生物合成 |
| Cluster-28155.1 | 叶绿体中的蛋白质定位 |
| Cluster-6823.0 | 类异戊二烯生物合成过程 |
| Cluster-8984.1 | 二磷酸异戊烯酯生物合成过程的调控, 甲基赤藓糖醇 4-磷酸途径 |
| Cluster-27858.0 | 叶片衰老 |
| Cluster-31284.2 | 叶绿素分解代谢过程的调控 |
| Cluster-24015.3 | 蛋白质多肽-脯氨酸异构化 |
| Cluster-19380.0 | 蛋白质折叠 |
| Cluster-26772.3 | 磷脂酰肌醇介导的信号 |
| Cluster-23385.5 | 蛋白质氧化 |
| Cluster-27976.3 | 脂多糖代谢过程 |
| Cluster-17454.6 | 蔗糖代谢过程 |
| Cluster-18797.0 | 葡聚糖生物合成过程 |
| Cluster-22156.12 | 葡萄糖代谢过程 |
| Cluster-23976.0 | 葡萄糖 6-磷酸代谢过程 |

表 4 KOG 富集结果中与植物生长发育相关的 20 个代表性基因

Table 4 20 representative genes related to plant growth and development in KOG enrichment results

| KOG ID | KOG 类别 | 基因 ID | KOG 注释 | |
|---------|------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| KOG1192 | 能源生产和转换 | Cluster-20675.6 | UDP-葡萄糖醛基和 UDP-葡萄糖醛基转移酶 | |
| KOG1231 | | Cluster-21765.4 | 含有 FAD 结合结构域的蛋白质 | |
| KOG1231 | 碳水化合物运输和代谢 | Cluster-26092.0 | 含有 FAD 结合结构域的蛋白质 | |
| KOG2653 | | Cluster-23976.0 | 6-磷酸果糖脱氢酶 | |
| KOG1794 | | Cluster-6009.0 | N-乙酰氨基葡萄糖 | |
| KOG0626 | | Cluster-28565.3 | β-葡萄糖苷酶、乳糖酶根化酶及相关蛋白 | |
| KOG1543 | | 翻译后修饰, 蛋白质周转, 伴侣 | Cluster-24982.2 | 半胱氨酸蛋白酶 |
| KOG1339 | | | Cluster-14620.0 | 天门冬氨酰蛋白酶 |
| KOG1263 | | 次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢 | Cluster-17528.0 | 多铜氧化酶 |
| KOG0022 | | | Cluster-25591.7 | 醇脱氢酶 (III 类) |
| KOG0156 | | 一般功能预测 | Cluster-13472.0 | 细胞色素 P450 CYP2 亚家族 |
| KOG1663 | | | Cluster-16503.2 | O-甲基转移酶 |
| KOG0023 | Cluster-29754.4 | | 醇脱氢酶 (V 类) | |
| KOG0813 | Cluster-26105.0 | | 乙二醛酶 | |
| KOG0143 | Cluster-159.2 | | 铁/抗坏血酸家族氧化还原酶 | |
| KOG1269 | Cluster-29590.50 | | SAM-依赖型甲基转移酶 | |
| KOG0725 | Cluster-21034.0 | | 广泛底物特异性的还原酶 | |
| KOG0698 | 信号转导机制 | | Cluster-30054.0 | 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 |
| KOG0583 | | | Cluster-27698.0 | 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 |
| KOG0519 | | | Cluster-8057.31 | 信号转导组氨酸激酶 |

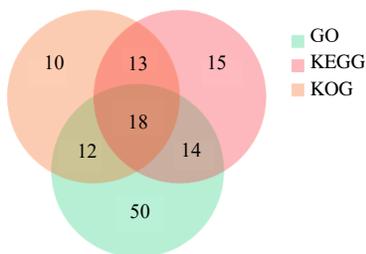


图 7 候选基因韦恩图

Fig. 7 Venn diagrams of candidate genes

的相关性。CTK、ABA 与质量呈极显著正相关，且 CTK 与 ABA 也存在显著的相关性。结果见表 6、7。

浙贝母内源 GA、ABA 对鳞茎生长发育已有一定的研究^[7]，而 CTK 对浙贝母鳞茎形成与发育的研究较少。因此，选择候选基因 *CKX3* (Cluster-26092.0) 和 *CKX9* (>Cluster-21765.4) 进行功能验证。

3.5.2 浙贝母 *CKX3* 和 *CKX9* 克隆 以转录组中 CDS 序列为参考，设计扩增引物(表 8)。以 cDNA 为模版进行基因克隆。扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳分别获得长度约为 900、1 200 bp 的 2 条条带(图 8)，将目的片段回收后进行测序，结果显示分别获得 830、1 197 bp 的浙贝母 *CKX3*、*CKX9*。

表 5 共同富集的候选基因

Table 5 Co-enriched candidate genes

| 基因 ID | 功能注释 |
|------------------|--------------------------------|
| Cluster-21182.2 | (+)-脱落酸 8'-羟化酶 |
| Cluster-6823.0 | 香叶酰香叶酰二磷酸合成酶 (II 型) |
| Cluster-21765.4 | 细胞分裂素脱氢酶 |
| Cluster-26092.0 | 细胞分裂素脱氢酶 |
| Cluster-8057.31 | 拟南芥组氨酸激酶 2/3/4 (细胞分裂素受体) |
| Cluster-8057.29 | 拟南芥组氨酸激酶 2/3/4 (细胞分裂素受体) |
| Cluster-16503.4 | 咖啡酰辅酶 a 氧甲基转移酶 |
| Cluster-29297.1 | 咖啡酰辅酶 a 氧甲基转移酶 |
| Cluster-159.2 | 可待因 3-O-脱甲基酶 |
| Cluster-28565.3 | β-葡萄糖苷酶 |
| Cluster-18797.0 | 1,4-葡聚糖分支酶 |
| Cluster-5544.3 | 糖原磷酸化酶 |
| Cluster-23976.0 | 6-磷酸葡萄糖醛脱氢 |
| Cluster-29342.1 | 二氢叶酸还原酶/胸苷酸合成酶 |
| Cluster-29754.4 | 肉桂醇脱氢酶 |
| Cluster-26693.8 | 肉桂醇脱氢酶 |
| Cluster-29478.15 | 咖啡酸 3-O-甲基转移酶/乙酰 5-羟色胺-O-甲基转移酶 |
| Cluster-3503.2 | 半胱氨酸合成酶 |

3.5.3 浙贝母 *CKX3* 和 *CKX9* 生物信息学分析 通过 Expasy 网站中的 ProtParam 软件对 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白序列进行理化性质的预测。结果显示，浙

表 6 “浙贝 1 号”鳞茎发育过程中内源激素与质量的相关性分析

Table 6 Correlation analysis of endogenous hormones and quality during bulb development of Zhebei No.1

| 激素 | 相关系数 | | | | |
|-----|---------|--------|---------|-------|-------|
| | FW | GA3 | ABA | IAA | CTK |
| FW | 1.000 | | | | |
| GA3 | 0.136* | 1.000 | | | |
| ABA | 0.821** | -0.076 | 1.000 | | |
| IAA | -0.004 | 0.307 | 0.239 | 1.000 | |
| CTK | 0.792** | 0.172 | 0.731** | 0.107 | 1.000 |

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

表 7 “浙贝 3 号”鳞茎发育过程中内源激素与质量的相关性分析

Table 7 Correlation analysis of endogenous hormones and quality during bulb development of Zhebei No.3

| 激素 | 相关系数 | | | | |
|-----|---------|----------|--------|-------|-------|
| | FW | GA3 | ABA | IAA | CTK |
| FW | 1.000 | | | | |
| GA3 | -0.539* | 1.000 | | | |
| ABA | 0.878** | -0.654** | 1.000 | | |
| IAA | 0.089 | -0.298 | 0.327 | 1.000 | |
| CTK | 0.511** | -0.110 | 0.625* | 0.415 | 1.000 |

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

贝母 *CKX3* 编码的氨基酸数为 259，等电点为 4.79，属于酸性蛋白；浙贝母 *CKX9* 编码的氨基酸数为 420，等电点为 8.33，属于碱性蛋白。*CKX3* 和 *CKX9* 编码的蛋白均为稳定蛋白，同时它们也均为亲水蛋白。

利用 SOPMA 对 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白序列进

行二级结构预测，利用在线软件 TMHMM2.0 对浙贝母 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白序列进行跨膜区的预测。结果显示，*CKX3* 编码的蛋白不存在跨膜区，属于非跨膜蛋白，其二级结构主要由 35.52% α -螺旋，8.88% β -转角、22.39% 延伸链和 33.20% 无规则卷曲组成；*CKX9* 编码的蛋白同样不存在跨膜区，属于非跨膜蛋白，其二级结构主要由 32.87% α -螺旋，6.53% β -转角、18.18% 延伸链和 42.42% 无规则卷曲组成。其中，2 个基因编码蛋白的二级结构中 β -转角结构占比均最低。

通过 NCBI 网站中 Conserved domains Research 软件对 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白序列进行保守结构域的预测，结果显示，*CKX3*、*CKX9* 蛋白保守结构域预测均为细胞分裂素脱氢酶，编号为 PLN02441。根据 Plant-PLoc 对浙贝母 *CKX3*、*CKX9* 进行亚细胞定位预测，结果显示，*CKX3* 定位在细胞外，*CKX9* 定位在液泡。经 SignalP-4.1 在线软件对其信号肽进行预测，结果显示，*CKX3* 与 *CKX9* 编码蛋白都存在信号肽，属于分泌性蛋白（图 9-A）。*CKX3* 编码蛋白的信号肽剪切位点位于第 19~20 号氨基酸，*CKX9* 编码蛋白的信号肽剪切位点位于第 24~25 号氨基酸。通过 Alphafold 2 对 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白序列进行三级结构预测，结果表明 2 个基因的三级结构都符合细胞分裂素脱氢酶的特征（图 9-B）。

表 8 基因克隆、过表达及原核表达所用引物

Table 8 Primers used in gene cloning, overexpression and prokaryotic expression

| 项目 | 引物名称 | 序列 (5'-3') |
|--------------|-----------------------|---|
| 基因克隆 | <i>CKX3</i> -F | ATGATACATCTCCTTCTCCAATTTTTTC |
| | <i>CKX3</i> -R | TCAAGAAACAAATAATTCAATTGATGAT |
| | <i>CKX9</i> -F | ATGCAAAGTGTCAACATCCCT |
| | <i>CKX9</i> -R | TTAAACATACTTGGATCTGTTCACGG |
| 过表达载体构建 | p- <i>CKX3</i> -flagF | CGGTACCCGGGGATCCATGCAAAGTGTCAACATCCC |
| | p- <i>CKX3</i> -flagR | GGGCGAATTGGTCGACAACATACTTGGATCTGTTCACGGGG |
| | p- <i>CKX9</i> -flagF | CGGTACCCGGGGATCCATGATACATCTCCTTCTCCA |
| | p- <i>CKX9</i> -flagR | ATTGGTCGACTCTAGAAGAAACAAATAATTCAATTGATGA |
| 亚细胞定位载体构建 | GFP- <i>CKX3</i> -F | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG |
| | GFP- <i>CKX3</i> -R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG |
| | GFP- <i>CKX9</i> -F | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC |
| | GFP- <i>CKX9</i> -R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG |
| 本式烟草 qRT-PCR | Nb- <i>CKX3</i> -F | TCCACATTTGCCAGAGACCA |
| | Nb- <i>CKX3</i> -R | ACAAAGTGGCTGGCTTGAAC |
| | Nb- <i>CKX9</i> -F | TCTCTGTTGGAGGAACTCTCTCT |
| | Nb- <i>CKX9</i> -R | ACCTGTGATAACATCCATTTCAAGA |
| | Nb- <i>ACT</i> -F | CAAGGAAATCACCGCTTTGG |
| | Nb- <i>ACT</i> -R | AAGGGATGCGAGGATGGA |
| 过表达阳性验证 | POS-flag | TCATTTGTCATCATCGTCTTTGTAGT |
| 亚细胞定位阳性验证 | M13 rev | GTCATAGCTGTTTCCTG |

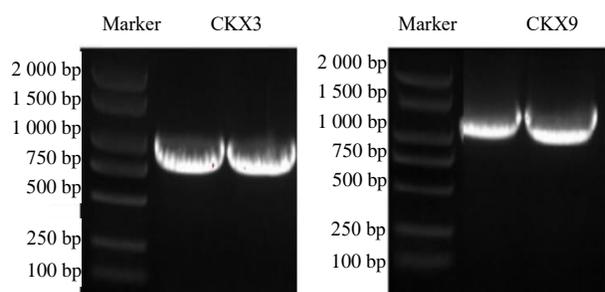
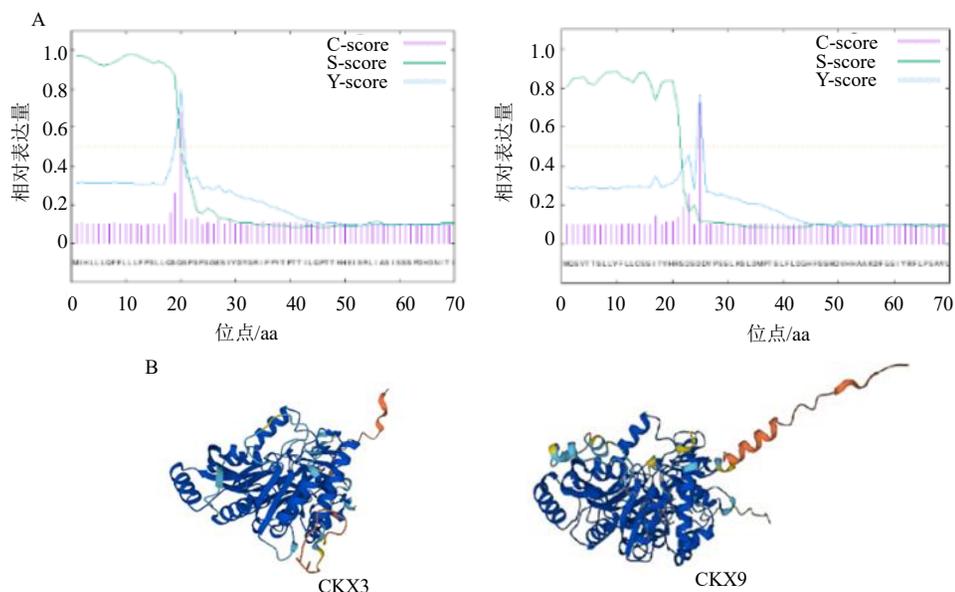


图 8 CKX3、CKX9 基因 RT-PCR 扩增电泳图

Fig. 8 Electrophoresis of RT-PCR amplification of CKX3 and CKX9 genes

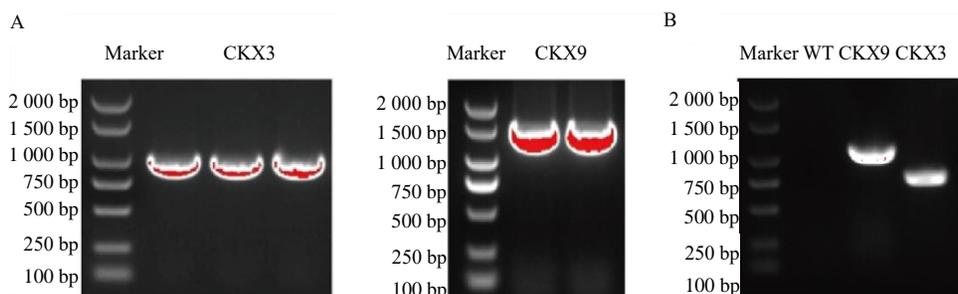
3.5.4 烟草瞬时过表达及亚细胞定位 根据 CKX3、CKX9 序列和表达载体序列选择酶切位点，CKX3 过表达载体酶切位点为 BamH I 和 Xba I，CKX9 过表达载体酶切位点为 BamH I 和 Sal I。设计引物（表 8）并构建过表达载体 35S-3×FLAG-1300: CKX3 和 35S-3×FLAG-1300: CKX9。提取农杆菌瞬时侵染后的烟草叶片 DNA 及 RNA。以 DNA 为模板，以 CKX3-F 或 CKX9-F 为上游引物，POS-flag 为下游引物进行 PCR，经琼脂糖凝胶电泳结果显示，成功获得了瞬时过表达的烟草叶片（图 10-A）。通过 GateWay 法构建 pGWB505-eGFP:CKX3 和



A-信号肽预测；B-蛋白质三级结构预测，蓝色表示置信度大于 90，浅蓝色表示置信度为 <70~90，黄色表示置信度为 50~70，橙色表示置信度低于 50。
A-signal peptide prediction; B-tertiary structure prediction, blue indicates confidence greater than 90, light blue indicates confidence <70~90, yellow indicates confidence 50~70, orange indicates confidence less than 50.

图 9 信号肽及三级结构预测

Fig. 9 Prediction of signal peptide and protein tertiary structure



A-过表达阳性鉴定；B-亚细胞定位阳性验证。

A-positive identification of overexpression; B-positive subcellular localization.

图 10 瞬时转化烟草的阳性鉴定

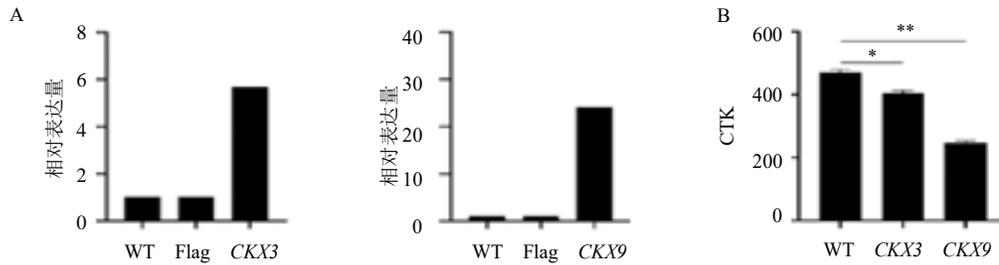
Fig. 10 Positive identification of transient transformed tobacco

pGWB505-eGFP:CKX9 载体。以野生型和侵染后的烟草叶片 DNA 为模板，以 CKX3-F 或 CKX9-F 为上游引物，M13 rev 为下游引物进行 PCR，经琼脂糖凝胶电泳结果显示，成功获得了可用于亚细胞定位的烟草叶片。

设计引物（表 8），对过表达的烟草叶片进行相对表达量测定。结果发现（图 11-A），过表达后烟草叶片中 CKX3 是野生型表达量的 24.02 倍；CKX9 是野

生型表达量的 4.16 倍。对过表达的烟草叶片进行细胞分裂素含量测定，结果发现（图 11-B），过表达后烟草叶片中的细胞分裂素含量较野生型叶片显著降低。

将培养好的烟草叶片使用激光共聚焦显微镜进行观察，根据 GFP 绿色荧光的表达分析 CKX3 和 CKX9 编码蛋白的表达情况。结果如图 12 所示，携带 eGFP 的 CKX3 和 CKX9 编码蛋白都定位于细胞膜上。



A-相对表达量；B-CTK 含量变化；WT-野生型烟草；Flag-空载对照烟草；*表示差异显著 ($P < 0.05$)，**表示极显著差异 ($P < 0.01$)。
A-Relative expression; B-CTK content changes; WT-Wild type tobacco; Flag-Empty vector control tobacco; *indicates a significant difference ($P < 0.05$), **indicates a highly significant difference ($P < 0.01$).

图 11 CKX3 和 CKX9 瞬时过表达后烟草的表达量及 CTK 量变化

Fig. 11 Changes of expression and CTK content after transient transfection of *Nicotiana benthamiana*

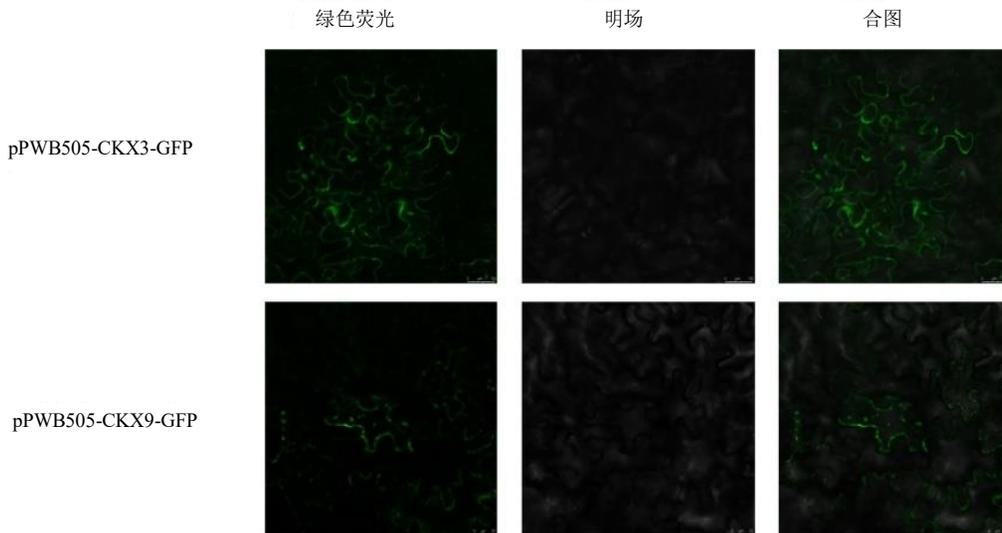


图 12 CKX3 和 CKX9 蛋白的亚细胞定位图

Fig. 12 Subcellular localization map of CKX3 and CKX9 protein

4 讨论

浙贝母鳞茎的形成与发育受到多因素的复杂调控，在糖代谢、淀粉合成、内源激素及信号转导、蛋白质合成代谢等调控机制作用下，鳞茎形成并逐渐膨大。

本研究从“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”2 个具有显著差异的品种中挖掘出了 132 个与浙贝母鳞茎

形成与发育相关的基因。132 个基因中有较多的基因富集于碳代谢、蔗糖代谢、淀粉合成等与淀粉积累相关的通路，如 *GBE1* (Cluster-18797.0)、*INV* (Cluster-29507.3)、*PYG* (Cluster-5544.3) 等上调基因及 β -*G* (Cluster-28565.3)、*SUS2* (Cluster-17454.6)、*glgC* (Cluster-28565.3) 等下调基因。在兰州百合^[19]、石蒜^[20]等植物中，*SUS* 等基因已被证实具有促进淀

粉合成的功能。“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”相比，“浙贝 1 号”的单鳞茎体积比“浙贝 3 号”大，“浙贝 1 号”高：直径为 1:0.9~1.3，而“浙贝 3 号”高：直径为 1:1.3~2.5^[1]。单鳞茎体积与淀粉积累的相关基因功能和表达水平一致，表明淀粉积累可能是浙贝母成熟期鳞茎膨大的重要因素。

先前已有研究发现，百合鳞片基底区域富含蛋白质和淀粉的情况下，会出现剧烈的细胞分裂，形成白点，推测这一现象可能是鳞茎形成的起始^[21-22]。从候选基因中发现 *asnB* (Cluster-26786.0)、*HIBADH* (Cluster-8968.0)、*ADHI* (Cluster-25591.7) 等氨基酸代谢基因在浙贝 3 号中低表达，而 *argF* (Cluster-23374.1)、*TYRAAT* (Cluster-10875.0)、*CEP* (Cluster-24982.2) 等氨基酸合成基因和翻译后修饰基因高表达。蛋白质的积累可能为新鳞茎的形成提供物质基础。

植物内源激素及激素信号转导相关的基因在候选基因中显著富集。从候选基因中发现了与 ABA 相关的 *ABA2* (Cluster-21034.0) 和 *CYP707A* (Cluster-21182.2) 及信号转导基因 *SNRK2* (Cluster-27698.0)；与 GA 相关的 *GGPS* (Cluster-6823.0)；与 IAA 相关的 *ASMT* (Cluster-29478.15) 和 *DAO* (Cluster-27115.0) 及信号转导基因 *AUX/IAA* (Cluster-29607.0) 和 *ARF* (Cluster-23117.0)；与 CTK 相关的 *CKX3* (Cluster-26092.0) 和 *CKX9* (Cluster-21765.4) 及信号转导基因 *AHK2_3_4* (Cluster-8057.29, Cluster-8057.31)；与乙烯 (Ethylene) 相关的 *cysK* (Cluster-3503.2)、*serA* (cluster-30583.0) 和 *ACO* (Cluster-16985.0) 及信号转导基因 *MKK4_5* (Cluster-22288.0)；与油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 相关的 *SMT1* (Cluster-20511.0) 及信号转导基因 *BRI1* (Cluster-20784.0)；与水杨酸 (salicylic acid, SA) 相关的 *tyrAa* (Cluster-10875.0) 及信号转导基因 *TGA* (Cluster-29466.0)。与“浙贝 1 号”相比，“浙贝 3 号”中 ABA、GA、CTK、BR 相关候选基因的表达水平能够促进相应激素含量的提高并发挥功能；而 IAA、乙烯和 SA 相关候选基因的表达水平会降低相应激素的含量。SA 对百合鳞茎膨大无明显作用，但是可以显著增加鳞茎数量并对蛋白质含量的提高有显著的积极作用^[23-24]。ABA 可能参与了淀粉积累的过程而 CTK 对鳞茎膨大起到一定作用^[25-26]。同时，成熟期“浙贝 3 号”鳞茎中较高的 GA、ABA、CTK 和较低的 IAA 可能会被部分保

留用于新鳞茎的形成，这可能是“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”之间鳞茎繁殖系数产生差异的原因之一。BR 和乙烯在百合科植物，尤其是鳞茎发育研究中报道较少。有研究表明^[27]，BR 对马铃薯块茎发育有着促进作用。浙贝母鳞茎发育过程中 ACO 基因表达量不断提高，推测可能与鳞茎发育相关^[28]，但是具体的作用和作用机制有待探究。

分别对“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”鳞茎质量与 GA、ABA、CTK 和 IAA 进行了相关性分析。发现 GA 在“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”中呈现相反的作用，与前人结果相似^[8-9]，预示不同浓度的 GA 对鳞茎的形成及发育有着潜在的调节作用。虽然 IAA 与其他指标都不具有显著相关性，但是有研究表明 BR 与 IAA 具有强烈的协同作用^[29]，因此 IAA 可能通过对其他激素的调节而对鳞茎形成及发育产生影响。“浙贝 1 号”和“浙贝 3 号”中，CTK、ABA 都对鳞茎发育起到促进作用且 CTK 与 ABA 也呈显著正相关。ABA 对浙贝母鳞茎膨大具有促进作用，而 CTK 的报道较少，ABA 与 CTK 在植物体内的平衡状态可能是影响浙贝母鳞茎形成及发育的因素之一。

鉴于 CTK 对浙贝母鳞茎的形成与发育全过程可能起到重要作用，本研究对浙贝母 *CKX3* 和 *CKX9* 进行了初步的功能验证。通过生物信息学发现，*CKX3* 和 *CKX9* 蛋白保守结构域为细胞分裂素脱氢酶，编号为 PLN02441。同时，三级结构也符合细胞分裂素脱氢酶基本特征。对本氏烟草叶片进行瞬时过表达发现，转染成功后 *CKX3*、*CKX9* 基因表达量获得了明显的提高且 CTK 的含量也有显著降低，浙贝 3 号中 *CKXs* 的低表达有利于 CTK 的积累，对鳞茎发育起到促进作用。在本氏烟草叶片中进行亚细胞定位，结果显示 *CKX3*、*CKX9* 编码蛋白均定位于细胞膜上。

本研究通过转录组测序技术筛选出 *ABA2*、*TGA*、*CKXs*、*BRI1* 等基因，并对 *CKXs* 进行了初步的功能验证，初步揭示了浙贝母鳞茎形成与发育的基因调控机制，可为浙贝母鳞茎发育研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 江建铭, 俞信光, 王文静, 等. 浙贝母新品种“浙贝 3 号”的选育与品种特性 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 448-453.
- [2] 何伯伟, 周书军, 陈爱良, 等. 浙贝母浙贝 1 号特征特

- 性及栽培加工技术 [J]. 浙江农业科学, 2014(6): 833-835.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 304.
- [4] Nile S H, Su J J, Wu D, *et al.* *Fritillaria thunbergii* Miq. (Zhe Beimu): A review on its traditional uses, phytochemical profile and pharmacological properties [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112289.
- [5] 金泽兰, 董云哲, 林宏峻, 等. 3 种干燥方式对浙贝母淀粉结构与功能特性的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(2): 80-89.
- [6] 李梓铭, 泮仪晨, 范小平, 等. 浙贝母淀粉、蔗糖代谢相关基因的克隆与表达分析 [J]. 核农学报, 2021, 35(11): 2470-2481.
- [7] 李梓铭, 范小平, 金泽兰, 等. 浙贝母 GA20ox、NCED、IAA 的克隆、表达及在鳞茎发育中的作用 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(9): 1710-1721.
- [8] Tang N, Ju X T, Hu Y F, *et al.* Effects of temperature and plant growth regulators on the scale propagation of *Lilium davidii* var. *unicolor* [J]. *Hort Sci*, 2020, 55(6): 870-875.
- [9] Fang S Z, Yang C L, Ali M M, *et al.* Transcriptome analysis reveals the molecular regularity mechanism underlying stem bulblet formation in oriental lily 'siberia'; functional characterization of the *LoLOB18* gene [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15246.
- [10] Xin Y, Chen X, Liang J H, *et al.* Auxin regulates bulbil initiation by mediating sucrose metabolism in *Lilium lancifolium* [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(4): uhae054.
- [11] Liang J H, Chen Y Z, Hou J Q, *et al.* Cytokinins influence bulblet formation by modulating sugar metabolism and endogenous hormones in Asiatic hybrid lily [J]. *Ornam Plant Res*, 2023, 3(1).
- [12] Buchfink B, Xie C, Huson D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [13] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [14] Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée J Y, *et al.* SARTools: A DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-seq data [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157022.
- [15] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [16] 冯亚斌, 施鑫磊, 俞信光, 等. 浙贝母肌动蛋白基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 126-130.
- [17] Jumper J, Evans R, Pritzel A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [18] Varadi M, Anyango S, Deshpande M, *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D439-D444.
- [19] Li W T, Huang D J, Wang B, *et al.* Changes of starch and sucrose content and related gene expression during the growth and development of Lanzhou lily bulb [J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0262506.
- [20] 许俊旭, 李青竹, 李叶, 等. 石蒜鳞茎膨大过程中碳水化合物代谢相关基因的差异表达研究 [J]. 核农学报, 2021, 35(10): 2250-2257.
- [21] Marinangeli P A, Hernández L F, Pellegrini C P, *et al.* Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum* [J]. *Jashs*, 2003, 128(3): 324-329.
- [22] Yang P P, Xu L F, Xu H, *et al.* Histological and transcriptomic analysis during bulbil formation in *Lilium lancifolium* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1508.
- [23] 张彦妮, 李兆婷, 张艳波, 等. 毛百合试管鳞茎形成和膨大的培养优化 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44 (04): 74-78.
- [24] 景艳莉, 刘芳. 水杨酸浸球处理对百合小鳞茎膨大发育影响 [J]. 北方园艺, 2010(5): 116-118.
- [25] Mandal S, Ghorai M, Anand U, *et al.* Cytokinins: A genetic target for increasing yield potential in the CRISPR era [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 883930.
- [26] Raspor M, Motyka V, Ninković S, *et al.* Endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in *in vitro* grown potato: A contribution to potato hormonomics [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3437.
- [27] Deng R, Huang S H, Du J, *et al.* The brassinosteroid receptor StBR11 promotes tuber development by enhancing plasma membrane H⁺-ATPase activity in potato [J]. *Plant Cell*, 2024, 36(9): 3498-3520.
- [28] 丁楚蔚, 李梓铭, 陈志, 等. 浙贝母 ACO 基因克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(10): 3229-3236.
- [29] Khan R, Ma X H, Hussain Q, *et al.* Application of 2, 4-epibrassinolide improves drought tolerance in tobacco through physiological and biochemical mechanisms [J]. *Biology*, 2022, 11(8): 1192.

[责任编辑 时圣明]