

• 分子生药学 •

茅苍术 *Aux*/*IAA* 基因家族鉴定 及其对生长素的响应分析

陈雷¹, 何梓荣¹, 陈袁袁¹, 孙琳棋¹, 王萌¹, 黄晓¹, 邓娟¹, 李谦¹, 余坤^{1, 2*}

(1. 湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430065;

2. 湖北中医药大学 湖北省中药资源与化学重点实验室, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 利用茅苍术全基因组数据, 识别鉴定生长素(*Aux*)/吲哚-3-乙酸(*IAA*) 基因家族成员, 并探究萘乙酸(*NAA*) 处理对这一家族基因表达量的影响, 为进一步研究茅苍术 *Aux*(*AlAux*)/*IAA* 基因家族的功能提供基础。利用 TBtools-II 从茅苍术全基因组数据中鉴定 *AlAux*/*IAA* 基因家族成员, 使用生物信息学分析软件分析蛋白质理化性质, 构建系统进化树, 预测基因保守基序和基因结构。以茅苍术组培苗为实验材料, 通过转录组测序筛选 *AlAux*/*IAA* 基因家族关键基因, 分析 *NAA* 处理 1 个月中关键 *AlAux*/*IAA* 基因的表达情况。茅苍术全基因组鉴定得到 53 个 *AlAux*/*IAA* 基因。*AlAux*/*IAA* 蛋白大部分定位于细胞核内, 不含跨膜区, 为负疏水性, 有 44 个 *AlAux*/*IAA* 基因可能编码功能性 *Aux*/*IAA* 转运蛋白。转录组测序和 RT-qPCR 分析表明, *AlAux*/*IAA* 家族基因表达有时空特异性, 各成员对 *NAA* 响应的时间和强度有所差异, 组织差异性表达结果显示 *AlAux*/*IAA* 基因家族总体上在花中表达量较高。该研究获得了茅苍术 *Aux*/*IAA* 基因家族序列, 初步分析了序列特征, 并分析了该基因家族响应 *Aux* 的表达特征, 推测 *AlAux*/*IAA*13、*AlAux*/*IAA*38 可能参与茅苍术组培苗继代培养生根和芽的生长发育, 为揭示 *AlAux*/*IAA* 基因功能和 *Aux* 调控茅苍术根茎生长的分子机制提供理论依据。

[关键词] 茅苍术; *Aux*/*IAA* 基因家族; 全基因组鉴定; 基因表达; 生物信息学

Identification of *Aux*/*IAA* gene family in *Atractylodes lancea* and their response to auxin

CHEN Lei¹, HE Zi-mo¹, CHEN Yuan-yuan¹, SUN Lin-qi¹, WANG Meng¹, HUANG Xiao¹, DENG Juan¹, LI Qian¹, YU Kun^{1, 2*}

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Chemistry, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060, China)

[Abstract] Using the whole-genome data of *Atractylodes lancea*, members of the auxin (*Aux*)/indole-3-acetic acid (*IAA*) gene family were identified and characterized, and the effects of 1-naphthaleneacetic acid (*NAA*) treatment on the expression levels of this gene family were investigated, providing a foundation for further studies on the functions of the *A. lancea* *Aux* (*AlAux*)/*IAA* gene family. Members of the *AlAux*/*IAA* gene family were identified from the *A. lancea* whole-genome data using TBtools-II. Bioinformatics software was employed to analyze the physicochemical properties of the encoded proteins, construct a phylogenetic tree, and predict conserved motifs and gene structures. Tissue-cultured seedlings of *A. lancea* were used as experimental materials, and key genes of the *AlAux*/*IAA* gene family were screened by transcriptome sequencing. The expression of key *AlAux*/*IAA* genes was analyzed after one month of *NAA* treatment. A total of 53 *AlAux*/*IAA* genes were identified from the *A. lancea* genome. Most *AlAux*/*IAA* proteins were

[收稿日期] 2025-08-20

[基金项目] 湖北省重点研发计划项目(2023BBB151); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T2022020); 湖北省教育厅青年项目(Q20222013); 中药资源与中药化学湖北省重点实验室开放基金项目(KLRCCM2409)

[通信作者] * 余坤, E-mail: yुकun_hbctm@163.com

[作者简介] 陈雷, 博士研究生, E-mail: 1261089410@qq.com

localized in the nucleus, lacked transmembrane domains, and exhibited negative hydrophobicity. Among them, 44 *AlAux/IAA* genes were predicted to encode functional Aux/IAA transport proteins. Transcriptome sequencing and RT-qPCR analyses showed that the *AlAux/IAA* family genes exhibited spatiotemporal expression specificity, and different members displayed varying response times and intensities to NAA treatment. Tissue-specific expression analysis revealed that the *AlAux/IAA* gene family was generally highly expressed in flowers. This study identified the Aux/IAA gene family members in *A. lancea*, preliminarily analyzed their sequence characteristics, and examined their expression features in response to Aux. It is speculated that *AlAux/IAA13* and *AlAux/IAA38* may be involved in rooting and bud growth and development during the subculture process of *A. lancea* tissue-cultured seedlings. These results provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanisms of *AlAux/IAA* gene function and Aux-mediated regulation of rhizome growth in *A. lancea*.

[Key words] *Atractylodes lancea*; Aux/IAA gene family; genome-wide identification; gene expression; bioinformatics

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20250929.401

生长素(Aux)是调控植物生长发育的关键信号分子,在协调多种发育过程中发挥重要作用,包括细胞伸长、细胞分裂和分化、向光性和向重力性、根和芽的发生、器官模式、维管发育、组织培养和顶端优势等,是植物发生的基础^[1-2]。在植物组织培养过程中,添加Aux对组织培养材料离体再生起着至关重要的作用,选用适宜的激素配比能够提高试管苗增殖系数。研究发现,Aux影响植物组织及器官的再生,在薄壳山核桃 *Carya illinoensis* 嫁接过程中,Aux及Aux/吲哚-3-乙酸(IAA)基因家族可能在愈伤组织形成以及维管组织再生过程中起着重要的作用^[3];在桑树 *Morus notabilis* 扦插中,Aux及Aux/IAA基因家族影响桑树生根和叶片的正常舒展^[4]。植物对Aux的响应比较复杂,研究Aux的反应机制对深入认识植物生长发育的过程意义重大。

植物Aux早期应答基因主要包括Aux/IAA、生长素酰胺合成酶(GH3)和生长素上调小RNA(SAUR)3类基因家族^[5]。其中Aux/IAA基因家族编码半衰期较短的原初响应蛋白,Aux/IAA蛋白是Aux信号通路的核心负调控因子,其降解受运输抑制剂响应蛋白1(TIR1)/生长素信号F-box蛋白(AFB)受体介导,研究表明萘乙酸(NAA)与TIR1/AFB受体亲和力高,能有效触发Aux/IAA蛋白的泛素化降解,稳定且持续地激活Aux信号传导^[6-7]。Aux/IAA蛋白的特征是具有4个典型的保守结构域(Domain I、Domain II、Domain III、Domain IV),该基因家族中也包括缺失1个或2个结构域的蛋白质。结构域I有阻遏作用,可抑制Aux信号下游基因的表达^[8];结构域II具有控制Aux/IAA蛋白降解的功能;Aux浓度低时,结构域III和结构域IV会抑制Aux响应基因的表达^[9]。

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本植物,是2025年版《中国药典》规定的中药苍术的基原植物之一,根状茎具有健脾燥湿、祛风散寒、明目等功效,常用于治疗湿阻中焦、脘腹胀满、眼目昏涩等^[10]。其药用历史已有2 000多年,是中医诊疗方剂中出现频率较高的中药之一。目前茅苍术药材主产于湖北、河南、安徽等地。由于野生茅苍术资源日趋匮乏,而市场需求迫切,规模化、规范化开展人工栽培已经成为必然趋势^[11]。传统的根茎切块繁殖方法存在繁殖系数不高、生长周期长、品种退化等问题,限制了快速繁殖及新品种选育等工作。离体培养可弥补传统繁殖方法的不足,在较短时期内扩大繁殖优良品种,并能利用遗传转化技术在短期内培育新品种。但茅苍术组织培养各个生长发育阶段所需激素的浓度和配比各不一样,例如不同外植体愈伤组织的诱导、再分化,组培苗的增殖、生根以及继代培养等对于外源激素尤其是Aux的使用尚无定论^[12-13],茅苍术关键基因家族对Aux处理下的响应未见报道。

NAA是茅苍术组织培养过程中广泛应用的一种Aux类似物,作用与Aux相似,因其使用成本低,耐高温高压,不易被分解破坏,在组织培养中的启动能力强,常用于工厂化大规模生产^[14-15]。相对于IAA,NAA是外源合成物质,植物体内无天然合成途径,不易被IAA氧化酶/水解酶降解;其抗光解能力强,在培养基中能维持长期稳定的有效浓度。因此选择NAA作为激素胁迫处理来研究茅苍术幼苗中Aux/IAA基因家族的表达响应,可以清晰区分“胁迫信号”与内源背景,精准解析Aux/IAA基因的响应模式。研究发现,NAA能与内源激素协同促进茶 *Camellia sinensis* 不定根的形成^[15],适宜浓度的外源

NAA 处理可显著增加扦插薄壳山核桃幼苗根系中 IAA 以及脱落酸 (ABA) 的含量^[3,14]。在茅苍术组织培养中 NAA 被广泛用于其生长发育的各个阶段,例如愈伤组织的诱导、丛芽增殖和生根、土培和水培炼苗等都取得了良好的效果^[12-13]。本研究鉴定了茅苍术 *Aux*(*AlAux*)/*IAA* 基因家族成员的蛋白序列,对其理化性质、系统发育树、基因结构等进行了较为全面的生物信息学分析。以不同继代培养周期的茅苍术组培苗作为研究 *Aux*/IAA 基因家族表达模式的对象,覆盖了组培苗不同生理状态和变异风险的阶段,研究长期继代过程中基因表达的动态变化模式。通过分析茅苍术组织培养中 NAA 处理对 *AlAux*/IAA 基因家族表达量的调控作用,以期为后续阐明该基因家族功能提供依据,为阐明茅苍术生长发育机制和优化培养技术奠定基础。

1 材料

1.1 样品 2021 年 11 月采集湖北英山田间种植茅苍术的种子,经湖北中医药大学刘合钢教授鉴定为菊科植物茅苍术 *A. lancea* 的种子,经无菌播种和筛选得到叶色浓绿、植株健壮的初代(0 代)茅苍术无菌苗。后续每 30 d 进行 1 次继代培养。继代培养基: MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂^[12-13]。培养条件: 光照 14 h·d⁻¹, 光强 15 000 Lux, 温度 25 ℃, 湿度 70%。

1.2 仪器与试剂 LED 植物生长气候箱(宁波科晟实验仪器有限公司), StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。MS 培养基(青岛海博生物技术有限公司,批号 HB8469-5); 琼脂(广州赛国生物科技有限公司,批号 EZ654E07BF); 蔗糖(国药集团化学试剂有限公司,批号 10021463); 6-BA、NAA(北京兰杰柯科技有限公司,批号分别为 RS033、BS182); 植物总 RNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号 20230333); 2×SYBR® Green Pro Taq HS Premix、Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒(湖南艾科瑞生物技术有限公司,批号分别为 A3A1986、A4A2302); RT-qPCR 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 方法

2.1 数据来源 茅苍术全基因组序列, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 蛋白序列(<https://www.uniprot.org/uniprot/>)、氨基酸序列和相应的注释文件(http://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index),

水稻 *Oryza sativa* 蛋白数据库(<https://rapdb.dna.afrc.go.jp/tools/blast>)。本文报告的茅苍术数据保存在中国国家生物信息中心/中国科学院北京基因组研究所(<https://ngdc.cncb.ac.cn/omix>: 登录号 OMIX010791; <https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa>: 登录号 CRA027257)。

2.2 *AlAux*/IAA 基因家族成员提取鉴定 以拟南芥 *Aux*/IAA(*AtAux*/IAA) 基因家族的蛋白序列为参考筛选茅苍术全基因组数据, 获得了 *Aux*/IAA 结构域的 HMM 模型(PF02309), 利用 TBtools-II(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 提供的 Simple HMM Search 功能检索到茅苍术的 *Aux*/IAA 基因家族^[16]; 接着利用 TBtools-II 中 BLAST 进一步验证结果, 筛选出具有完整 *Aux*/IAA 结构域的蛋白序列, 并命名为 *AlAux*/IAA。

2.3 *AlAux*/IAA 基因家族成员生物信息学分析 基于获得的 *AlAux*/IAA 家族基因序列, 使用 TBtools-II 测定这些基因的染色体位置, 计算 CDS 长度和氨基酸数。使用 Expasy(<https://web.expasy.org/>) 获得 *AlAux*/IAA 蛋白的相对分子质量、等电点和亲水性, 使用在线分析工具 Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测亚细胞定位场所, 并使用 TMHMM 2.0(<https://ser-vices.healthtech.dtu.dk/>) 查看跨膜结构域。

采用 MEGA 7.0 软件中的 Muscle 比对工具, 对茅苍术和拟南芥、水稻的 *Aux*/IAA 基因家族蛋白序列进行比对^[17-18], 运用邻接算法(NJ)构建系统进化树, 最后通过 evolview 在线平台(<https://www.evol-genius.info/evolview/>) 对系统进化树进行分类和标注。使用 MCScanX(<https://github.com/wyp1125/MCScanX>) 软件分析茅苍术与拟南芥种间的 *Aux*/IAA 基因共线性关系; 利用 MEME 在线工具(<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对 *AlAux*/IAA 基因家族成员的保守基序进行检测; 保守结构域的信息通过 NCBI-CDD 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 获得, 接着结合茅苍术的基因组注释文件分析 *AlAux*/IAA 基因的结构; 最后, 运用 TBtools-II 软件进行可视化展示。

2.4 转录组测序及 RT-qPCR 验证 以茅苍术组培苗全株为实验材料, 选取同一个无性系继代培养的第 3 代(早期/稳定期)、第 10 代(中期/潜在变异积累期)和第 17 代(后期/高度退化风险期)等 3 份组

育苗样本(各3个生物学重复),一部分做转录组测序,剩余样本-80℃冰箱保存用于RT-qPCR验证。茅苍术不同器官部位的转录组测序实验材料取自田间成熟茅苍术植株的根茎、茎、须根、花、叶。高通量测序得到的原始数据经碱基识别、过滤和质量检测得到 clean reads,将 clean reads 与茅苍术参考基因组序列进行对比,并检测 clean reads 在参考序列上的分布与覆盖率,进行二次质控。得到基因在各个样品中的表达量后使用 DESeq2(1.26.0)进行基因差异表达分析,筛选阈值为 $P_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ 。采用 SYBR 法对筛选的差异基因进行 RT-qPCR 验证,并以延伸因子 1- α ($EF1-\alpha$) 作为内参基因, $EF1-\alpha$ -F: 5'-ACCAACTGGGTGACAACT-GAAGT-3', $EF1-\alpha$ -R: 5'-AGCCTCGGTAAGGGCT-TCAT-3'。通过 NCBI 设计引物并进行荧光定量分析。实时荧光定量 PCR 按照以下步骤进行扩增: 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s; 60℃退火 30 s; 40 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。利用 SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析。

2.5 $AlAux/IAA$ 基因在 NAA 处理下不同时期的表达量测定 取同一无性系未添加过外源激素培养的茅苍术组培苗为实验材料,在 MS 培养基中添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,其余培养条件不变。鉴于茅苍术继代培养周期为 30 d,后续选取 NAA 激素处理时长为 1、7、14、21、28 d 的组培苗全株进行 RT-qPCR 检测,以同基因型未添加过外源激素培养的茅苍术组培苗作为对照组。统计转录组测序结果中具有代表性的关键 $AlAux/IAA$ 基因不同时间段的表达情况。

3 结果

3.1 $AlAux/IAA$ 基因家族成员鉴定及理化性质分析 在茅苍术的基因组中共鉴定出 53 个 Aux/IAA 基因。根据它们在染色体上的位置,被命名为 $AlAux/IAA1 \sim AlAux/IAA53$ 。 $AlAux/IAA$ 基因编码区的长度范围为 168($AlAux/IAA45$) ~ 3 282 bp($AlAux/IAA22$)。编码由 55~1 093 个氨基酸组成的蛋白质,相对分子质量范围为 6 455.82~121 218.16,等电点范围为 5.12~9.79。除 $AlAux/IAA45$ 蛋白为正疏水性外,其余 52 个 $AlAux/IAA$ 蛋白的平均疏水指数为负值,表明 $AlAux/IAA$ 偏向亲水性蛋白质。除了 $AlAux/IAA9$ 被预测定位于叶绿体和细胞核外,其他 $AlAux/IAA$ 成员都位于细胞核上,说明该家族基因主要在细胞核中发挥功能。大部分 $AlAux/IAA$

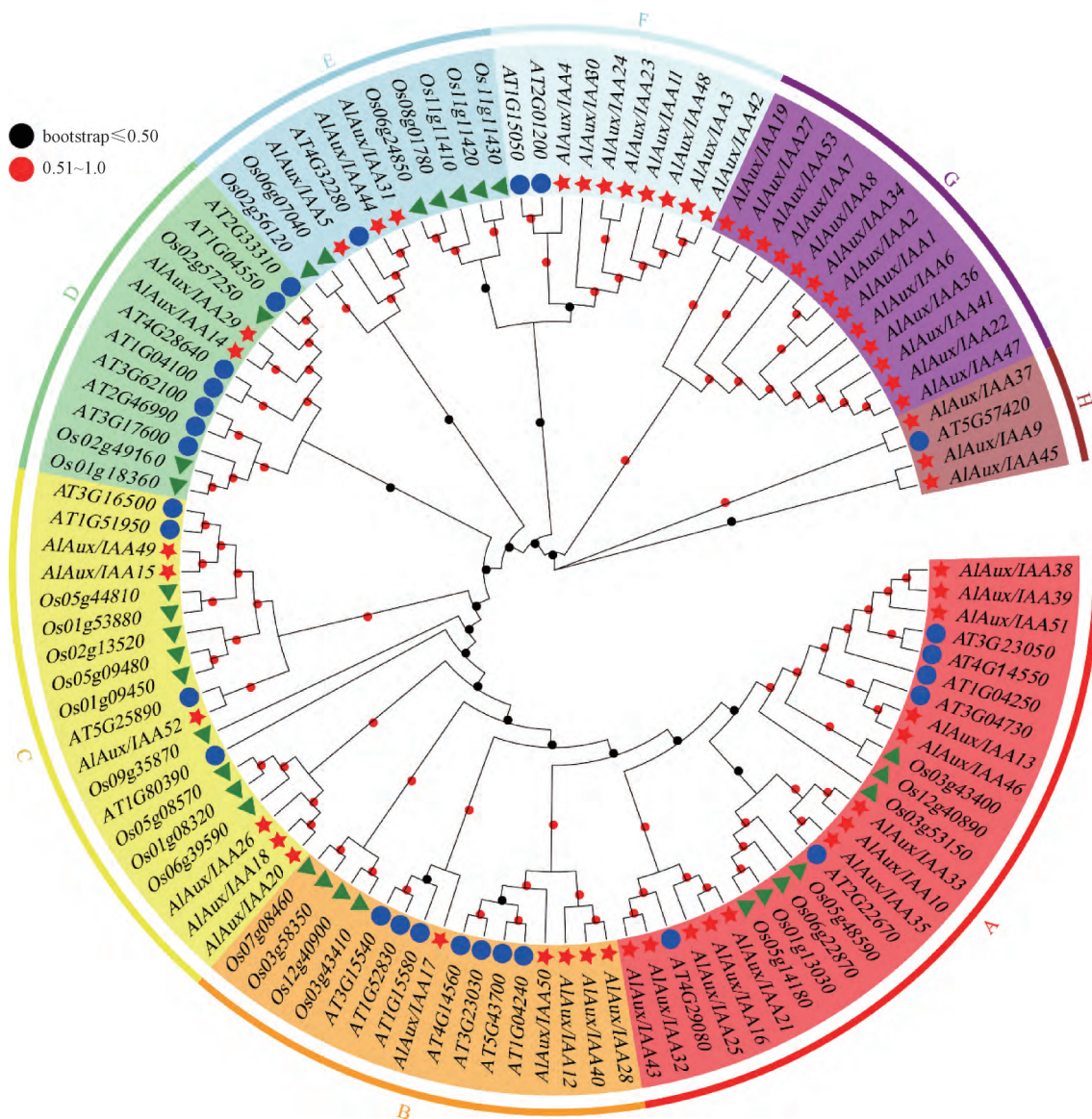
蛋白不含跨膜区,仅 $AlAux/IAA9$ 、 $AlAux/IAA47$ 蛋白各自含有 1 个跨膜结构域。

3.2 $AlAux/IAA$ 基因家族系统进化分析 将 53 个 $AlAux/IAA$ 基因与 29 个拟南芥和 31 个水稻 Aux/IAA 基因家族构建系统发育树。依据系统发育亲缘关系和保守基序特征将茅苍术、拟南芥和水稻的 Aux/IAA 基因共分为 8 个亚家族,命名为 A、B、C、D、E、F、G、H,对应系统发育树颜色从红色顺时针渐变至棕色,见图 1。每个亚家族包含的植物基因数量各不相同,亚家族 A 基因数目最多,有 13 个茅苍术基因、6 个拟南芥基因、7 个水稻基因;亚家族 G 最为特殊,包含 13 个茅苍术基因,不含拟南芥基因和水稻基因;亲缘关系最远的亚家族 H 包含 3 个茅苍术基因、1 个拟南芥基因,不含水稻基因。系统发育分析结果显示,茅苍术 Aux/IAA 家族成员总数显著超过拟南芥和水稻,F、G、H 这 3 组亲缘关系和其他组别较远,包含 24 个茅苍术基因和 3 个拟南芥基因,且亚家族 G 只有 $AlAux/IAA$,表明该物种在进化中发生了亚家族特异性扩张,这可能与茅苍术通过基因复制和功能获得,提升环境适应性相关。

3.3 染色体定位及物种内的共线性分析 染色体定位见图 2。结果表明,53 个 $AlAux/IAA$ 基因分散在 12 条染色体上,分布不均匀。在 chr4 上发现了基因簇,包括 $AlAux/IAA$ 家族的 6 个成员(11.32%),chr7 和 chr11 上分别只有 1 个 $AlAux/IAA$ 基因。基因组内共线性分析显示,茅苍术基因组中存在明显的 $AlAux/IAA$ 基因重复现象。在 53 个 $AlAux/IAA$ 基因中,鉴定出 22 次基因片段重复事件,这些重复事件分布于除 11 号染色体外的所有染色体,推测这些基因可能具有相似功能。

3.4 $AlAux/IAA$ 基因家族种间同源性分析 茅苍术与拟南芥的共线性分析揭示了 35 对同源基因,见图 3,与系统发育树预测一致,表明 Aux/IAA 基因在不同物种间具有保守性。这些结果可以通过参考在模式植物中深入研究的亲缘关系接近和基因组共线的基因来帮助预测单个 $AlAux/IAA$ 基因的功能。

3.5 $AlAux/IAA$ 基因家族成员的保守基序与基因结构预测 保守基序和结构域分析为研究 $AlAux/IAA$ 基因的功能和分类提供了初步的理论依据。使用 MEME 在 $AlAux/IAA$ 蛋白序列中鉴定出 10 个相关的保守基序,见图 4A。Motif1、Motif2、Motif3、Motif7 分别对应于 Domain II、Domain I、Domain III、



五角星代表茅苍术; 圆形代表拟南芥; 三角形代表水稻; A~H 分别表示 *Aux/IAA* 基因不同亚家族。

图 1 茅苍术、拟南芥和水稻 *Aux/IAA* 基因家族系统发育进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Aux/IAA* gene family in *Atractylodes lancea*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*

Domain IV, 也是 *AlAux/IAA* 蛋白中出现频率最高的基序(见中国知网本文增强出版附加材料)。Domain II 保守程度最高, 为 51 个(96.2%) *AlAux/IAA* 家族基因所共有, 其次是 Domain I (79.2%), 含有 Domain I 的 *AlAux/IAA* 蛋白必定包含 Domain II, 表明两者功能可能具有相关性。进化树结果显示, 同一亚组的基因具有相似的基因结构, 其中进化树 G 组都包含 Motif1、Motif2 特有的 Motif4、Motif5、Motif8、Motif9 和 Motif10 是其他亚组中所没有的, 分析后发现也不存在于拟南芥和水稻的 *Aux/IAA* 基因

家族中。*Aux/IAA* 基因家族特异性的保守基序对植物适应不断变化的环境条件至关重要^[19-20]。

对 *AlAux/IAA* 家族基因分析, 发现 *AlAux/IAA* 基因核酸序列长度存在差异, 且核酸序列中内含子数量不同, 除 *AlAux/IAA3*、*AlAux/IAA4*、*AlAux/IAA9*、*AlAux/IAA25*、*AlAux/IAA37*、*AlAux/IAA42*、*AlAux/IAA47*、*AlAux/IAA48*、*AlAux/IAA49* 不含非翻译区(UTR)外, 其他的 *AlAux/IAA* 基因家族都含有数目不等的 UTR 和编码序列(CDS), 说明大部分 *AlAux/IAA* 基因都可能编码功能性 *Aux/IAA* 转运蛋白, 见图 4B。

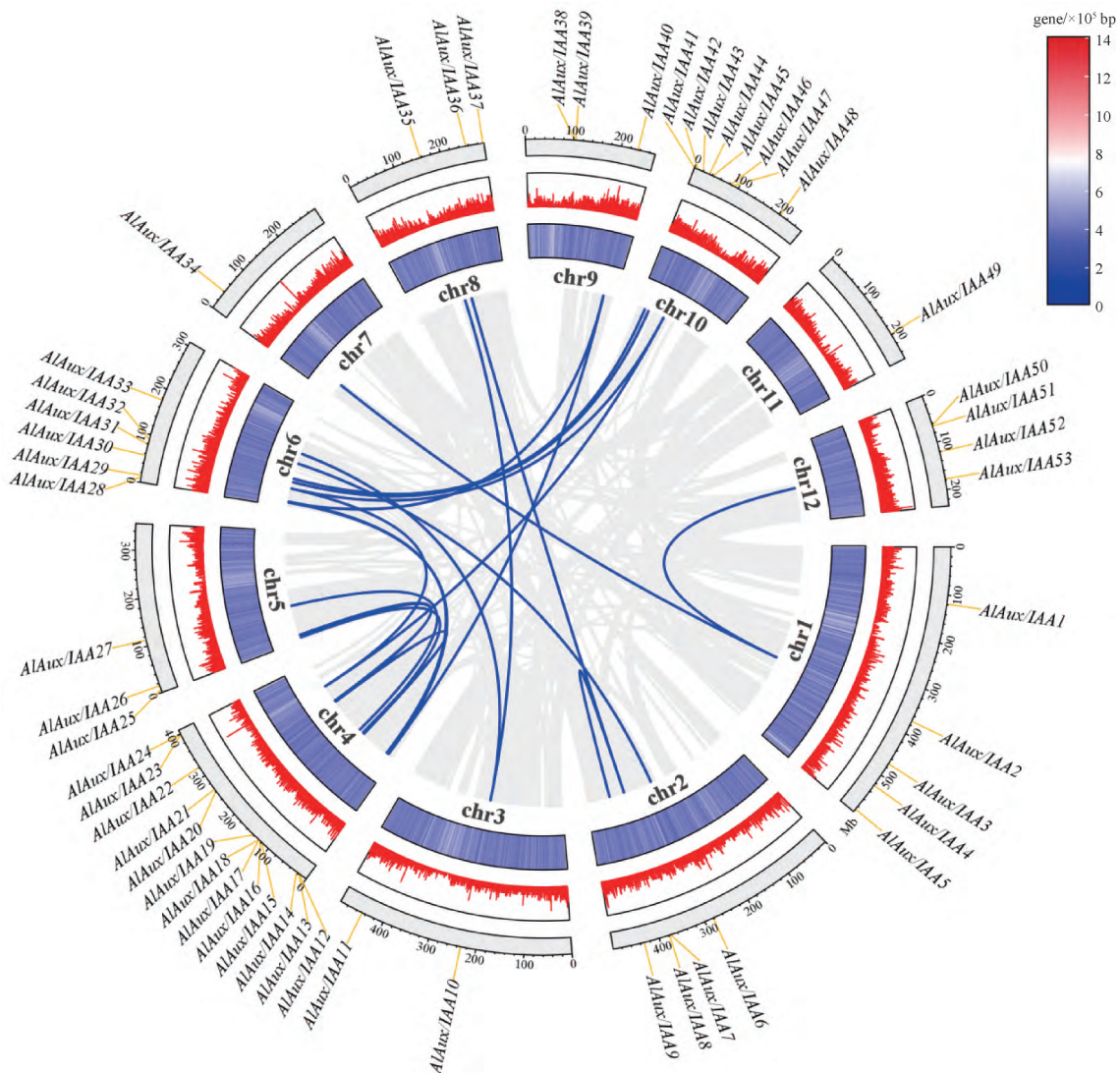


图 2 AlAux/IAA 基因家族种内同源性分析
Fig.2 Intrasppecific synteny analysis of AlAux/IAA gene family

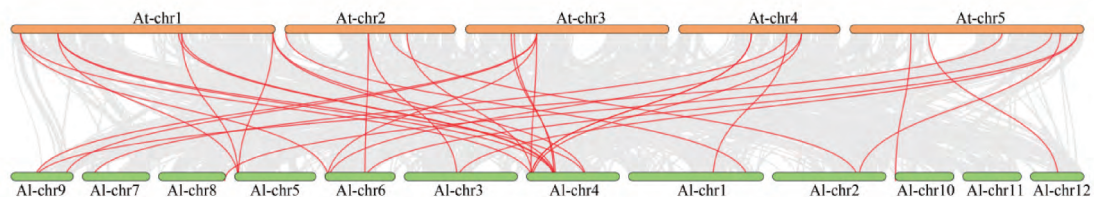


图 3 茅苍术与拟南芥基因组间 Aux/IAA 家族基因共线性分析
Fig.3 Collinear analysis of Aux/IAA family genes between *Atractylodes lancea* and *Arabidopsis thaliana*

3.6 AlAux/IAA 基因在茅苍术组培苗中的表达 从转录组测序数据中得到 53 个 AlAux/IAA 基因的表达量数据并绘制热图(见中国知网本文增强出版附加材料)。结果显示,大部分 AlAux/IAA 在各代茅苍

术组培苗中以相对较高的水平表达,表达量较稳定。结合系统进化树和保守结构域发现 F、H 亚家族中 11 个 AlAux/IAA 基因表达量较低,这可能与其 AlAux/IAA 蛋白缺乏完整的保守结构域或保守基序

图 4 *AlAux/IAA* 基因家族保守基序 (A) 和基因结构 (B)Fig.4 Conserved motifs (A) and gene structure (B) of *AlAux/IAA* gene family

有关,因为非典型 *Aux/IAA* 蛋白在植物组织中的表达量常常较低^[21-22],反之 A、B、G 亚家族中的 *AlAux/IAA* 基因的相对表达量较高。在茅苍术继代培养过程中,相较于第 3 代组培苗,第 10 代有 10 个 *AlAux/IAA* 基因显著上调,10 个下调;第 17 代分别有 3 个上调,13 个下调。其中第 10 代和第 17 代组培苗中 *AlAux/IAA* 基因表达量均显著升高的是 *AlAux/IAA7*、*AlAux/IAA16*、*AlAux/IAA19*;均显著降低的有 10 个 (*AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA14*、*AlAux/IAA29*、*AlAux/IAA31*、*AlAux/IAA38*、*AlAux/IAA39*、*AlAux/IAA40*、*AlAux/IAA44*、*AlAux/IAA46*、*AlAux/IAA51*)。

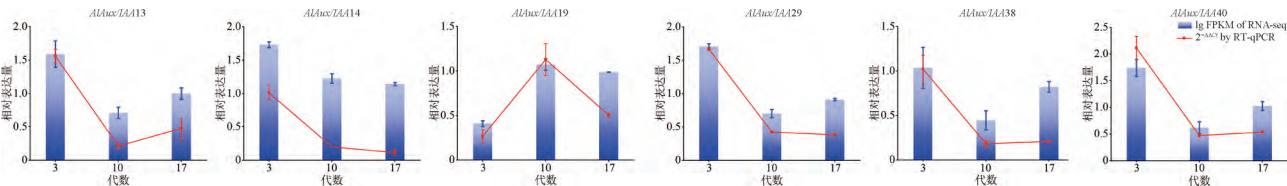
3.7 RT-qPCR 验证 选取不同亚家族(基因之间相似度低)并且显著差异表达的 6 个 *AlAux/IAA* 基因,引物序列见表 1,使用 RT-qPCR 进行转录组基因表达验证,结果显示表达趋势较为一致,见图 5,在茅苍术组培苗第 10 代中 *AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA14*、*AlAux/IAA29*、*AlAux/IAA38*、*AlAux/IAA40* 表现为显著下调,*AlAux/IAA19* 表现为显著上调。

3.8 *AlAux/IAA* 基因家族基因在 NAA 处理下不同时间段的差异性表达 为了探究植物组织培养过程中 *AlAux/IAA* 家族基因在 NAA 处理下不同时间段的表达情况,本研究以表 1 中 6 个 *AlAux/IAA* 基因

表 1 差异表达基因引物序列信息

Table 1 Primer sequence information of differentially expressed genes

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>AlAux/IAA13</i>	GTGCTGTGTCGGTGGTTG	TTGTGATAGATCATTTGGCGTCTTCC
<i>AlAux/IAA14</i>	TGATGGCGGTGGTGGAGTG	ATGAAGTAACCTCAGCAGACATAACC
<i>AlAux/IAA19</i>	GAGCATTATGTCCATCCTAACCGAAG	TGGAGATATGAAGGAAGTGGCAGAG
<i>AlAux/IAA29</i>	AGGACGACGACAACAACATCAC	CGAACCACCACCGATACTCAATC
<i>AlAux/IAA38</i>	GAGGCGCGGCTGTGAG	CATTCAGATCAGTGAAGATGAGGAC
<i>AlAux/IAA40</i>	ATCTGCACCACCCACCAAGG	ATTCCGTCGTCTCCATCTTCTCTC



FPKM. 每百万映射片段中来自某一基因平均每 1 000 碱基长度的片段数目(图 7 同)。

图 5 差异表达基因的 RT-qPCR 验证($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.5 Validation of differentially expressed genes using RT-qPCR($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

为主要研究对象进行检测,结果见图 6。*AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA38* 在组培苗中相对表达量较为一致,在 NAA 处理 7 d 后持续稳定上升,在第 28 天达到峰值,相对表达量为未经 NAA 处理幼苗中的 4 倍

左右;*AlAux/IAA29*、*AlAux/IAA40* 在组培苗中表达趋势相近,其相对表达量在 NAA 处理第 7 天达到峰值后有所降低;*AlAux/IAA14*、*AlAux/IAA19* 在施加 NAA 的 1 个月内相对表达量的起伏较稳定。

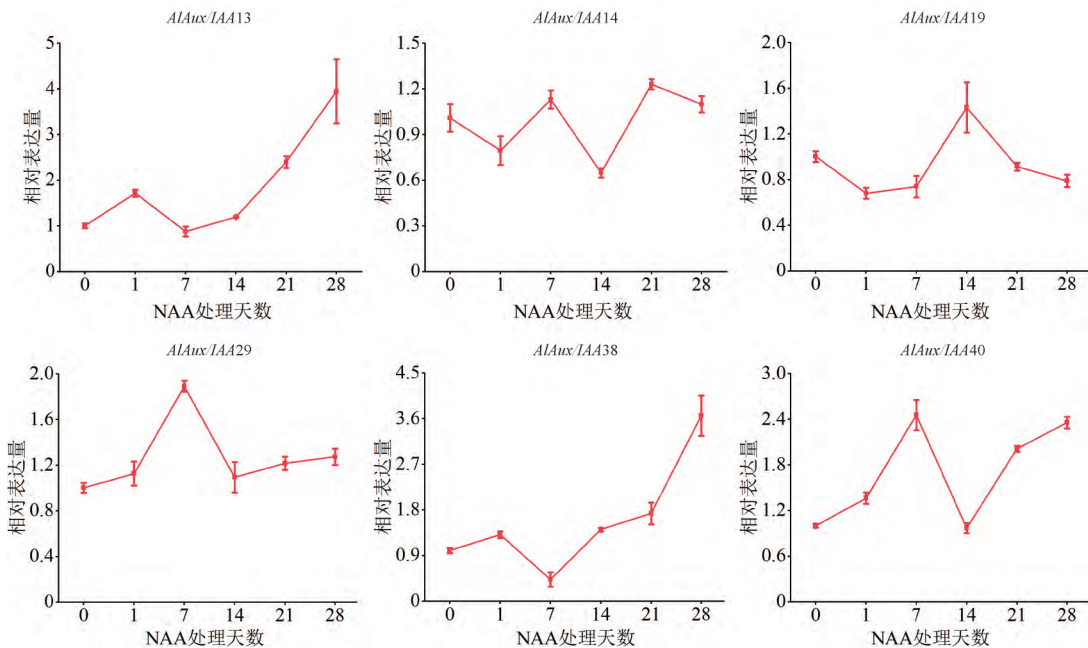


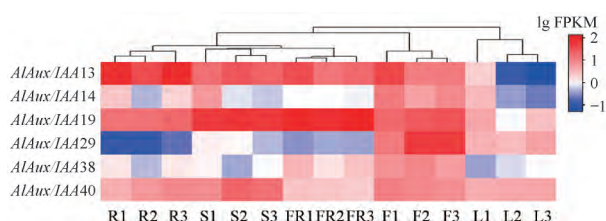
图 6 *AlAux/IAA* 关键基因在 NAA 处理下不同时间段的表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.6 Expression of *AlAux/IAA* key genes under NAA treatment at different time points($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

3.9 *AlAux/IAA* 基因家族组织差异性表达 利用茅苍术根茎、茎、须根、花、叶 5 个组织的转录组数据

分析 *AlAux/IAA* 的空间表达模式,结果见图 7。*AlAux/IAA* 在花中表达量较高;*AlAux/IAA13*、*AlAux/*

IAA19、*AlAux/IAA40* 在根茎、茎、须根、花中均高表达,可能参与多组织发育调控和基础生理过程的全局调控。*AlAux/IAA14*、*AlAux/IAA29* 特异高表达于花,其可能参与花芽发育的 Aux 信号响应。*AlAux/IAA38* 在花和须根中高表达,可能参与生殖和生根的组织功能。



R:根茎; S:茎; FR:须根; F:花; L:叶。

图 7 *AlAux/IAA* 在不同组织的表达热图

Fig.7 Expression heatmap of *AlAux/IAA* in different tissues

4 讨论

茅苍术是我国传统大宗药材,市场需求庞大,具有重要的经济价值、社会价值和药用价值。野生资源的枯竭和传统繁殖方法的广种薄收严重制约了茅苍术产业的发展。利用植物组织培养技术良种选育和茅苍术生长发育关键基因家族的“破译”势在必行。Aux 是植物生长发育的关键调控激素之一,明确其在茅苍术生长发育过程中的作用对苍术生长发育调控和生产管理极其重要,因此本研究对 *AlAux/IAA* 基因家族进行了鉴定、生物信息学分析和 Aux 响应分析。

基于茅苍术的全基因组数据,共发现了 53 个 *Aux/IAA* 家族基因,数量庞大,多于拟南芥 (29 个)、水稻 (31 个)、决明 (28 个)、龙眼 (18 个)^[17-18, 21-23],这可能与茅苍术自身复杂的遗传背景相关。*AlAux/IAA* 蛋白大部分定位于细胞核内,不含跨膜区,为负疏水性,可能编码功能性 *Aux/IAA* 转运蛋白。典型的 *Aux/IAA* 蛋白通常包含 4 个保守结构域,其中 19 个 *AlAux/IAA* 蛋白包含 4 个保守结构域,剩余 34 个 *AlAux/IAA* 蛋白存在不同程度的缺失现象。转录组结果显示非典型 *Aux/IAA* 基因在茅苍术组培苗中的表达水平低于典型 *Aux/IAA* 基因,或未被检测到。据报道,非典型的 *Aux/IAA* 基因家族蛋白对植物适应不断变化的环境条件同样重要^[8, 19-20],这些家族成员结构域的变化可能导致 Aux 信号通路功能的多样性,进一步促进了 *Aux/IAA* 在植物响应环境变

化中发挥多种作用。

转录组测序数据中筛选在茅苍术组培苗中表达量高、有代表性的 *AlAux/IAA*,采用 RT-qPCR 分析 *AlAux/IAA* 基因家族对 NAA 胁迫的响应,发现亚家族 A 中的 *AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA38* 基因表达量在 NAA 处理 7 d 后持续稳定上升,在 NAA 处理第 28 天后达到峰值。原因可能是 Aux 信号通路是一个典型的负反馈回路(见中国知网本文增强出版附加材料)^[6],当未添加外源激素茅苍术组培苗正常生长时 *Aux/IAA* 蛋白抑制 Aux 响应因子 (ARF),使 Aux 响应基因(包括 *Aux/IAA* 基因本身)处于低表达或关闭状态,添加 NAA 后则打破了这一平衡,NAA 进入细胞,与 TIR1/AFB 受体结合,启动泛素化降解途径,将大量 *Aux/IAA* 蛋白“刹车”清除掉,之前被抑制的 ARF 转录因子获得自由,被激活后启动大量下游基因的转录,这些基因包括促进细胞生长、分裂的基因(最终导致生理效应,如生根)和 *Aux/IAA* 基因本身^[7]。于是,细胞核内 *Aux/IAA* 基因的 mRNA 转录水平急剧增加,产生大量的 *Aux/IAA* 新 mRNA,证明 Aux 信号通路被有效激活。这和茅苍术组培苗在继代培养 1 个月中的下半月长势茂盛、新芽丛生的生理现象具有一致性。研究结果部分证明了 NAA 和 *Aux/IAA* 基因之间典型的“触发与反馈”关系——NAA 作为一个高效的外部信号,通过激活 Aux 信号通路,间接但强烈诱导了 *Aux/IAA* 基因本身的转录表达。

结合系统发育树和蛋白保守基序,*AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA38* 与拟南芥 *At3g23050* (*AtIAA19*)、*At1g04250* (*AtIAA17*)、*At2g22670* (*AtIAA8*) 聚在同一个亚家族 A,具有完整的 4 个保守结构域,是典型的 *Aux/IAA* 基因。在拟南芥中,研究显示 *At3g23050*、*At2g22670* 可能参与调节花芽发育、下胚轴和侧根的差异生长^[24-25];突变体 *At1g04250* 具有下胚轴明显变短、叶卷曲或无根毛等表型^[26]。由于同一亚家族中的基因结构相似,表达模式具有相似性和一致性,本文推测 *AlAux/IAA13*、*AlAux/IAA38* 具有调控茅苍术组培苗生根和丛芽发育的功能,同时 *AlAux/IAA* 基因家族组织差异性表达的结果也表明 *AlAux/IAA38* 特异性高表达于花和须根,*AlAux/IAA13* 在花和须根中大量表达。

综上所述,本研究基于茅苍术全基因组鉴定到 53 个 *AlAux/IAA*,利用生物信息学分析方法对

AlAux/IAA 基因家族成员进行预测分析,通过茅苍术组培苗继代培养不同阶段 AlAux/IAA 表达量分析及 Aux 诱导表达分析,筛选到可能参与茅苍术组培苗继代培养生根和芽的生长发育途径的候选基因 (AlAux/IAA13、AlAux/IAA38),说明了 NAA 和 Aux/IAA 基因之间典型的“触发与反馈”关系。后续将进一步对这些基因进行功能验证,以期为深入研究 AlAux/IAA 基因家族的功能提供基础,为探究茅苍术药用部位生长发育的分子机制提供基础。

[参考文献]

- [1] GOMES G L B, SCORTECCI K C. Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms [J]. *Plant Biol*, 2021, 23(6): 894.
- [2] MAZZONI-PUTMAN S M, BRUMOS J, ZHAO C S, et al. Auxin interactions with other hormones in plant development [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, 13(10): a039990.
- [3] 范平桦, 朱凯凯, 谭鹏鹏, 等. 薄壳山核桃 Aux/IAA 基因家族鉴定及其在嫁接愈合中的表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(8): 2554.
- [4] 冯曦, 豆浩, 孙佳佳, 等. 桑树 Aux/IAA 基因家族鉴定与 IBA 处理下表达模式分析 [J]. *河南农业大学学报*, 2023, 57(6): 936.
- [5] HAYASHI K. The interaction and integration of auxin signaling components [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(6): 965.
- [6] FIGUEIREDO M, STRADER L C. Intrinsic and extrinsic regulators of Aux/IAA protein degradation dynamics [J]. *Trends Biochem Sci*, 2022, 47(10): 865.
- [7] WEND S, DAL BOSCO C, KAMPF M M, et al. A quantitative ratiometric sensor for time-resolved analysis of auxin dynamics [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 2052.
- [8] TIWARI S B, HAGEN G, GUILFOYLE T J. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 533.
- [9] 李俊男, 燕晓杰, 李枢航, 等. 植物 AUX/IAA 基因家族研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(15): 89.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 173.
- [11] 张成才, 覃明, 郭秀芝, 等. 苍术植物新品种 DUS 测试指南的研制 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(6): 1515.
- [12] 李鸿盛, 刘梦茹, 侯文秋, 等. 药用植物茅苍术快繁及组织培养技术初探 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(5): 1611.
- [13] 宋刚, 徐银, 史俊, 等. 茅苍术规模化组培快繁体系的建立 [J]. *江西农业学报*, 2018, 30(9): 63.
- [14] 吴文浩, 曹凡, 刘壮壮, 等. NAA 对薄壳山核桃扦插生根过程中内源激素含量变化的影响 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2016, 40(5): 191.
- [15] WANG Y X, PANG D D, RUAN L, et al. Integrated transcriptome and hormonal analysis of naphthalene acetic acid-induced adventitious root formation of tea cuttings (*Camellia sinensis*) [J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1): 319.
- [16] CHEN C J, WU Y, LI J W, et al. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733.
- [17] LISCUM E, REED J W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(3/4): 387.
- [18] JAIN M, KAUR N, GARG R, et al. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Funct Integr Genomic*, 2006, 6(1): 47.
- [19] ZHANG J Q, LI S X, GAO X Q, et al. Genome-wide identification and expression pattern analysis of the Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) gene family in alfalfa (*Medicago sativa*) and the potential functions under drought stress [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 382.
- [20] GAO X, LIU X H, ZHANG H, et al. Genome-wide identification, expression, and interaction analysis of the auxin response factor and AUX/IAA gene families in *Vaccinium bracteatum* [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15): 8385.
- [21] 冯昭, 刘世鹏, 吕蕊花, 等. 决明 Aux/IAA 和 ARF 基因家族鉴定、表达及蛋白互作分析 [J]. *药学报*, 2024, 59(3): 751.
- [22] ZHOU X J, WU X Z, LI T J, et al. Identification, characterization, and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in *Brachypodium distachyon* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2018, 18(6): 709.
- [23] 梁钊, 张艺勇, 张梦媛, 等. 龙眼 Aux/IAA 基因家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. *果树学报*, 2021, 38(11): 1839.
- [24] WANG J, YAN D W, YUAN T T, et al. A gain-of-function mutation in IAA8 alters *Arabidopsis* floral organ development by change of jasmonic acid level [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 82(1): 71.
- [25] TATEMATSU K, KUMAGAI S, MUTO H, et al. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 379.
- [26] 刘丁源, 邱婷, 丁晓辉, 等. 快速构建多重 sgRNA 载体利用 CRISPR/Cas9 技术敲除拟南芥 IAA2 基因 [J]. *遗传*, 2016, 38(8): 756.

[责任编辑 马超一]