

## 不同枸杞水培条件下不定根发生的转录组比较分析

杨改儿<sup>1,2</sup>, 张璇<sup>1,2</sup>, 王嘉栋<sup>1,2</sup>, 张波<sup>3</sup>, 段淋渊<sup>3</sup>, 李翔<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>宁夏大学林业与草业学院, 银川 750021; <sup>2</sup>林木资源高效生产全国重点实验室, 银川 750021; <sup>3</sup>宁夏农林科学院枸杞科学研究所, 银川 750026

**摘要** 枸杞(*Lycium barbarum*)是重要经济林树种, 其扦插繁殖效率与不定根形成密切相关, 但枸杞不定根形成相关分子机制尚不明确, 制约了枸杞的规模化繁育及高效利用。为探究枸杞不定根发生的转录组差异, 本研究以3种生根能力差异的枸杞种质为材料, 通过水培试验分析其不定根发生过程中的转录水平差异。结果显示, 转录组测序分析鉴定出6448个差异表达基因(DEGs), 其中L-vs-H组DEGs数量最多, 达4413个, 包括上调2583个和下调1830个。转录因子分析鉴定出281个转录因子, 以MYB、AP2/ERF和bHLH家族为主, 且表达模式存在差异。GO富集分析发现1714个DEGs被富集到32个GO条目中, KEGG富集分析表明DEGs主要富集于苯丙烷生物合成和植物激素信号转导通路。其中, MYB19(Lba07g01820)是苯丙烷通路中的核心基因, TIR1(Lba08g00069)是植物激素信号转导通路中的核心基因, 它们在枸杞不定根发生过程中发挥重要作用。qRT-PCR验证了转录组数据的可靠性。本研究首次在枸杞中解析了不定根形成的转录调控网络, 为木本植物根系发育机制提供了新见解, 初步揭示了枸杞不定根形成的分子机理, 为枸杞及其他木本植物的遗传改良奠定了重要的理论基础。

**关键词** 枸杞, 水培, 不定根发生, 转录组学, 关键基因

枸杞(*Lycium barbarum*)是茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)多年生木本植物, 也是一种重要的药食同源植物(王雨心等, 2024)。枸杞在全球约有80余种, 主要分布于南美、北美、澳大利亚等多个国家和地区。在中国有7种3变种, 主要分布于宁夏、甘肃、山西、新疆、青海等地(如克亚·加帕尔等, 2013)。枸杞因具明目、抗氧化等多种功效而备受关注, 是宁夏乃至我国西北地区重要的经济林树种。据《中国枸杞产业蓝皮书(2024)》统计显示, 我国枸杞种植面积达356 hm<sup>2</sup>, 全产业链产值突破680亿元, 研究和开发价值巨大。此外, 枸杞具有耐寒、耐旱、耐瘠薄、耐盐碱等特点, 抗逆性及适应性较强, 也是重要的生态树种。长期生产实践发现, 枸杞根系发达且主根较深, 在树体支撑和养分输送方面具有重要作用。枸杞的繁殖方式主要包括种子繁殖、扦插和水培等。其中, 扦插是枸杞主要的无性繁殖方式, 具有操作简便、成活率高、能保持母本优良特性等优点, 但扦插过程受激素、代谢物等多种因素影响, 且不同品种/品系生根能力差异较大(孙雪莲等., 2021)。袁姜莲等(2025)在研究不同桑树品种在扦插条件下的生根效果时发现, 扦插生根率较低, 而添加植物激素可提高生根率; 张鹏迪等(2025)发现外源激素对提升沙枣嫩枝扦插生根率有极显著的促进作用。

收稿日期: 2025-04-25; 接受日期: 2025-09-02

基金项目: 宁夏重点研发计划(引才专项)(No.2024BEH04068)和宁夏自然科学基金(No.2023AAC05025)

\* 通讯作者。E-mail: lixiangphd@nxu.edu.cn

不定根(adventitious root, AR)是指从植物茎、叶、根等部位生长出来的根,其诱导和发育是无性繁殖的关键环节,不仅影响植物的生长发育,还与植物的适应性和抗逆性密切相关(扈嘉鑫等, 2024)。植物不定根的形成是一个复杂的生物学过程,受到多种激素和遗传因子的调控,对于实现植物的高效繁殖和规模化利用具有重要意义(吴卫倩等, 2025)。研究表明,生长素在不定根的诱导过程中起着核心作用,其通过调控细胞分裂素、乙烯等激素的平衡来影响不定根的形成(Ángeles et al., 2022)。此外,一些转录因子家族也在不定根发生过程中发挥着重要的调控作用。在对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究中发现 *HY5* 正向调控不定根的发生(师雄, 2020)。对落叶松(*Larix gmelinii*)不定根发生基因进行分析发现, *AP2* 家族的转录因子高表达(李魁鹏, 2014); 魏斯佳(2024)在对柑橘(*Citrus reticulata*)不定根发生过程的基因转录动态与关键基因挖掘时发现 *CsARF7/19* 参与控制柑橘不定根的发育,相似的结果在水稻中得到了验证(章怡兰等, 2020)。 *WOX* 与 *LBD* 转录因子在植物不定根形成中扮演着重要角色,在杨树(*Populus*)中 *PagWOX11/12a* 正向调控 *PagSAUR36* 基因,促进杨树不定根发育(Liu et al., 2022); *ARF7* 和 *ARF19* 作为上游调控因子,通过激活 *LBD* 基因的表达,在拟南芥不定根形成过程中发挥关键的调控作用(Lee et al., 2019)。这些基因通过精细的调控网络,协调细胞的分裂、伸长和分化,从而促进不定根的发生和发育。枸杞具有较强的环境适应性,在干旱和盐碱等逆境条件下,通过调节生长素的极性运输和信号转导,增强不定根的形成能力。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,越来越多的研究开始关注植物不定根发生的相关基因及其调控机制。然而,关于枸杞不定根发生相关基因的研究鲜有报道,其分子调控机制尚未完全明确。

水培作为一种新兴的繁殖技术,因其操作简便、环境可控性强、成根速度快且不受季节限制而受到广泛关注,现已被应用于植物生长发育的研究中(Dutta et al., 2023)。课题组前期通过对 14 个不同枸杞品种/品系进行了扦插和水培生根能力比较研究(王嘉栋等, 2024),发现不同材料生根能力差异显著,但其潜在的分子调控机制仍不清晰。基于此,本研究通过转录组测序和生物信息学分析,进一步挖掘枸杞不定根发生过程中的关键基因,并利用实时荧光定量 PCR 技术对基因表达模式进行分析,为枸杞不定根形成的分子调控机制提供新的见解,通过鉴定与不定根形成相关的基因,为枸杞的无性繁殖提供理论支持,对加速枸杞的遗传改良进程具有重要意义。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

基于课题组前期对枸杞(*Lycium barbarum*)生根能力的综合评价研究结果(王嘉栋等, 2024), 本研究选用综合评价生根能力差异的三种枸杞种质作为供试材料(表 1), 于 2023 年 3 月份采自宁夏农林科学院枸杞研究所枸杞种质资源圃(38°39'N, 106°09'E), 均为硬枝穗条, 生长正常、无病虫害。做好标记, 带回实验室进行水培生根试验。



图 1 不同种质枸杞生根状态

Figure 1 Rooting status of different germplasm of wolfberry

表 1 试验材料基本信息

Table 1 Basic information of test material

Number	Germplasm	Natural rooting ability
H	C1	高
M	C4	中
L	C12	低

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 水培试验

将选取的枸杞一年生且距地面 50 cm 的枝条为试验材料, 将其去刺后进行修剪处理, 穗条的上切口为平切口, 下切口为斜切口, 倾斜角度为 45°, 插条长度约为 15 cm。准备 3 个 500 mL 的杯子, 分别加入 200 mL 蒸馏水, 每份材料选取 15 根穗条放入纸杯中。水培时间为 28 d, 在前一周室温较低时, 将穗条放置于人工气候箱内培养, 培养条件为白天光照 16 h, 夜间 8 h, 温度为 25°C, 湿度为 70%。后期则将其转移至光照充足的地方继续培养(正常

室温及室内环境)。每天更换一次水,并观察记录相关生根数。

### 1.2.2 表型指标测定

水培 28 d 后进行表型指标测定。每个品种水培植株生根株数,根长及根均随机选取十条根用游标卡尺进行测量,估算其平均生根数。计算数据得到平均根粗(mm)、平均根长数(mm)、平均生根数(条)、生根率(%)以及生根效果指数。

各根系指标的计算公式如下:

平均根长(mm)=选取的插穗生根长度总和/选取的根个数;

平均生根数(条)=插穗生根总数量/生根株插穗数;

平均根粗(mm)=选取的插穗生根总粗度/选取的根个数;

生根率(%)=生根株数/总插穗数;

生根效果指数=生根率×平均生根数×平均根长/生根插穗数。

### 1.2.3 RNA 提取、文库构建及转录组测序

各种质培养至第 28 d 后,取其根部组织进行转录组测序分析。采用试剂盒法提取根系总 RNA,参照 TaKaRa 试剂盒操作说明进行操作,每组设置 3 个生物学重复。使用 Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度和纯度,通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整性,并使用 Agilent 2100 测定 RIN 值。去除核糖体 RNA 后,将 RNA 片段化并合成 cDNA。经过纯化、末端修复、加 A 尾和连接测序接头等步骤后,筛选长度约为 200 bp 的 cDNA 片段进行 PCR 扩增和纯化,构建测序文库。文库经 Qubit 定量、片段分析仪检测 insert size,并通过 Q-PCR 确定有效浓度(>2 nmol·L<sup>-1</sup>)。最终,按照目标数据量进行 pooling,并使用 Illumina HiSeq 4000 平台进行测序。

### 1.2.4 差异表达基因鉴定及富集分析

原始测序数据(Raw data)经质控后获得干净数据(Clean data),利用 Hisat2 软件(Kim et al., 2015)将获得的 Clean data 与枸杞高质量参考基因组比对(Zhao et al., 2025),利用 FRKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)法对所有基因进行定量分析。基于 DESeq2 软件(Love et al., 2014)筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),具体参数为: (|log<sub>2</sub>FC|≥1, adjust P<0.05),并将获得的 DEGs 进行功能注释和富集分析。GO 富集分析基于 GO 数据库,应用超几何检验筛选显著富集的 GO Terms。KEGG 数据库用于 Pathway 显著性富集分析,通过超几何检验筛选差异表达基因中显著富集的 Pathway。利用 Cytoscape 软件(v3.8.2)对候选模块内基因集进行共表达网络分析,利用 cytoHubba 插件通过 MCC 算法和 Degree 算法挖掘与枸杞不定根形成密切相关的核心基因。转录组可视化(维恩图、热图、富集图等)通过 <https://cloud.metware.cn/>平台、TBtools 软件(Chen et al., 2020)和 Cytoscape 3.8.2 (Shannon et al., 2003)完成。

### 1.2.5 qRT-PCR 验证

为了验证枸杞水培根部组织转录组测序数据的可靠性,本研究选取了 6 个关键候选基

因, 用 IDT(<https://www.idtdna.com>)在线软件设计特异性引物(表 2), 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测基因表达水平的变化, PCR 反应体系为: TB12.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L 上游引物(F), 下游引物(R)1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补充至 8.5  $\mu$ L。反应程序为: 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 95°C 30 s, 95°C 10 s, 65°C 5 s, 95°C 5 s。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算基因相对表达量。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Lba01g02920</i>	GAGCAGGAAGTATTCGGAAGAG	TCTCACCTTGGCCTTTACTTC
<i>Lba02g02340</i>	TGATTCGGTCAAGGTTGGTG	TCAAAGGTGCATCAGGTGG
<i>Lba05g00045</i>	GGAGTACTATGCCAATGGAAGTAG	CTTCCTAAACTCCTCCACCATT
<i>Lba08g00069</i>	TGACTAGATATAGCAACGGGAATTG	AATCTTTCCACTACCCCAACTG
<i>Lba03g02895</i>	TGATTACATTGGTTTATCAGAAGTGG	AAAAGAGAAACCCAGGAGAC
<i>Lba07g01820</i>	AGAGAAACGGCAAAGACAGG	GGTTTTGGGATATGCACGTG

### 1.2.6 数据分析

采用 Microsoft Excel 进行数据整理; 使用 SPSS 27.0 进行方差分析与多重比较; 利用 Origin Pro 2024 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据质量评估

如表 3 所示, 所测的 9 个样品的 GC 含量  $\geq 42\%$ ; Q20 $\geq 97\%$  (Q20 表示过滤后质量数值大于 20%的碱基占总碱基的比值); Q30 $\geq 92\%$  (Q30 表示过滤后质量数值大于 30%的碱基占总碱基的比值)。综上所述, 本次试验测序样品质量较高, 可进行后续的转录组学分析。

表 3 枸杞测序数据结果

Table 3 Summary of wolfberry sequencing data

Sample	Raw data	Clean data	Clean base/bp	GC content/%	Q20/%	Q30/%
H-1	48404626	46717712	7.01	42.64	97.57	92.95
H-2	45878844	44315116	6.65	42.7	97.67	93.14
H-3	48327682	46516034	6.98	42.6	97.63	93.1
L-1	46659612	44897478	6.73	42.58	97.59	93.02
L-2	43250526	41506088	6.23	42.89	97.59	92.95
L-3	46562114	44939580	6.74	42.81	97.46	92.68
M-1	44204862	42262414	6.34	42.71	97.48	92.75
M-2	42387892	40971976	6.15	42.7	97.54	92.87
M-3	44474752	42938000	6.44	42.65	97.48	92.72

### 2.2 主成分分析及差异表达基因鉴定

对不同品系枸杞根系差异表达基因进行主成分分析, 结果如图 2A 所示, 主成分 1 和主成分 2 的解释率分别为 28.99%和 23.33%, 累计解释率为 52.32%。各处理组内样品分布较为集中, 不同处理组呈现离散分布, 表明不同样品间具有较大的差异, 适用于后续的转录组

数据分析。

为了解不同品系枸杞根系基因表达的变化,对不同品系枸杞根系的差异表达基因进行分析,结果显示(图 2B),差异表达基因(DEGs)总数与上调基因数量最多的是 L-vs-H,下调基因数量最少的是 M-vs-H。L-vs-H 含有的基因数量为 4413 个, M-vs-H 与 M-vs-L 包含的基因数分别为 3061 个、3151 个,其中 L-vs-H 中上调基因 2583 个, M-vs-L 中上调基因数为 2196 个,而 M-vs-L 中上调基因的数量相较于前两组显著减少,总计鉴定出 1924 个上调基因。由此可知,品系间基因表达差异对枸杞生根能力有重要影响,且特定基因可能在调控生根过程中发挥关键作用。

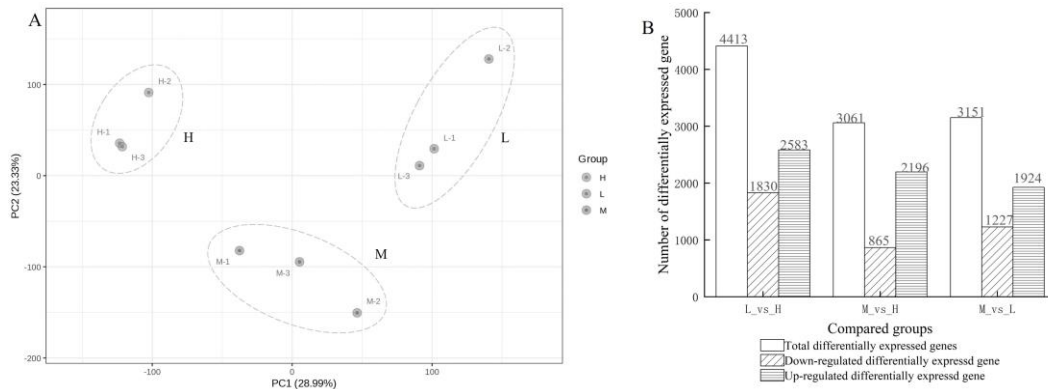


图 2 不同品系枸杞基因表达差异转录组学分析

(A) 不同品系枸杞主成分分析; (B) 不同品系枸杞比较组间的 DEGs

Figure 2 Transcriptomic analysis of gene expression differences among different strains of *Lycium barbarum*

(A) Principal component analysis of different strains of *Lycium barbarum*; (B) DEGs of different strains of Wolfberry between comparison groups

### 2.3 转录因子的鉴定与筛选

在本研究中,转录因子在枸杞生根过程中扮演着关键角色。通过筛选,共鉴定出来自 55 个不同家族的 281 个转录因子。表 4 展示数量排名前十的转录因子家族,其中 MYB、AP2/ERF-ERF 和 bHLH 家族的转录因子数量分别为 30 个、27 个和 20 个,位居前三。MYB 家族以 30 个转录因子的数量位居首位,表明其在研究对象中具有较高的表达水平和可能的调控功能。MYB 家族是植物中最大的转录因子家族之一,广泛参与植物生长发育、激素响应以及逆境胁迫等多种生物学过程。AP2/ERF 家族的两个分支 AP2/ERF-ERF 和 AP2/ERF-AP2,分别以 27 和 8 个转录因子的数量位列第二和第九位,其在植物的生长发育和逆境响应中具有重要功能,尤其是在植物激素信号转导和环境胁迫耐受性方面。bHLH 家族以 20 个转录因子的数量位居第三,该家族在植物的多种生物学过程中发挥调控作用,包括细胞分化、激素响应和次生代谢产物的合成等。

综上所述,表 4 中鉴定出的转录因子家族的表达特征揭示了枸杞不定根产生中可能存在的关键调控网络和生理过程。

表 4 数量前十转录因子

Table 4 The top ten transcription families in terms of expression quantity

Family name	The number of transcription factors
MYB	30
AP2/ERF-ERF	27
bHLH	20
MADS-MIKC	16
WRKY	15
LOB	14
NAC	12
B3 10	10
AP2/ERF-AP2	10
GRAS	8

## 2.4 差异表达基因 GO 及 KEGG 富集分析

GO 富集分析主要分为分子功能(molecular function, MF)、生物学过程(biological Process, BP)和细胞组分(cellular component, MF) 3 个大类。为了进一步研究不同品系枸杞在水培条件下不定根发生过程中 DEGs 的生物学功能, GO 富集分析表明, 一共富集到 32 个条目中, *P-value* 从小到大展示前 10 个条目(表 5)。表 5 中所有条目均为生物学过程(BP), DEGs 主要富集在氧化还原平衡、代谢过程、离子运输调控以及植物免疫反应方面。这些显著富集的生物学过程可能在不定根的形成和发育中发挥了关键作用, 为进一步研究枸杞不定根发生的分子机制提供了重要的线索和理论基础。

表 5 DEGs 的 GO 富集分析

Table 5 GO function analysis of DEGs

ID	Description
GO:0015074	DNA integration
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process
GO:0043269	regulation of ion transport
GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process
GO:0034762	regulation of transmembrane transport
GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process
GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process
GO:0044550	secondary metabolite biosynthetic process
GO:0034765	regulation of ion transmembrane transport
GO:0009626	plant-type hypersensitive response

通过对差异表达基因(DEGs)的 KEGG 富集分析, 本研究揭示了这些基因在多个关键生物过程中的潜在功能。如表 6 所示, 从 KEGG 富集通路中以 *P-value* 从小到大选取前 10 个通路进行展示。分析结果显示, DEGs 显著富集在苯丙烷生物合成(ko00940)、植物激素信号转导(ko04075)、次生代谢物的生物合成(ko01110)等通路。DEGs 富集涵盖了代谢、信号转导、植物与病原体互作等多个方面。其中, 代谢相关通路包括苯丙烷生物合成、次生代谢物

的生物合成、角质和蜡的生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、亚油酸代谢以及氨基糖和核苷酸糖代谢, 这些通路的富集表明 DEGs 可能在植物的生长发育、结构组成、抗氧化防御、抗逆性以及细胞壁合成等方面发挥重要作用。信号转导相关通路中, 植物激素信号转导和植物-病原互作通路的富集揭示了 DEGs 在植物激素调节、免疫反应激活以及病原体防御中的潜在功能。此外, DEGs 还富集于基底切除修复通路, 暗示其可能参与 DNA 损伤修复, 维持基因组稳定性; 而代谢途径的富集则反映了 DEGs 在细胞整体代谢网络中的广泛参与性。这些结果为深入理解 DEGs 在植物生理过程中的作用机制提供了重要线索, 也为后续的功能验证和应用研究奠定了基础。

表 6 DEGs 的 KEGG 富集分析

Table 6 KEGG enrichment analysis of DEGs

ID	Description
ko00940	Phenylpropanoid biosynthesis
ko04075	Plant hormone signal transduction
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites
ko04626	Plant-pathogen interaction
ko00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis
ko00592	alpha-Linolenic acid metabolism
ko01100	Metabolic pathways
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
ko03410	Base excision repair
ko00591	Linoleic acid metabolism

## 2.5 苯丙烷通路分析及关键基因筛选

苯丙烷代谢是植物次生代谢途径之一, 调控复杂且关键, 涉及植物生长发育、环境适应、细胞木质化、色素形成、根瘤形成及抗病免疫等。其代谢调控包括内部调控和外界诱导调控, 对植物生存至关重要。为了探索参与不同品系枸杞根系代谢的调控网络途径, 依托 KEGG 基因组信息数据库, 对检测到的 DEGs 所参与的代谢途径进行富集分析, 富集到基因数目最多的通路为苯丙烷通路。取数量前三的 TFs (MYB, AP2, bHLH) 与苯丙烷通路的基因进行 PPI 网络构建, 得到他们间的相互作用关系(图 3B)。将 PPI 结果导入 Cytoscape3.8.2 软件, 通过 MCC 算法和 Degree 算法得到排名前 10 的核心基因(图 3C)。结果显示, 转录因子中 MYB 家族的 MYB19 (Lba07g01820) 转录因子通过与苯丙烷通路 POX31 (Lba07g01438)、POX3 (Lba02g00972)、POX12 (Lba03g01880) 等基因互作进而参与枸杞不定根的形成。



的激素参与枸杞生根过程。生长素通路(auxin)的 *TIR1*、*ARF* 差异表达, *AUX/IAA* 被抑制; 植物生物胁迫抗性激素脱落酸(abscisic acid)通路中, *ABF* 差异表达, *PP2C*、*SnRK2* 的表达被抑制; 油菜素甾醇(brassinosteroid)通路中 *BRI1*、*BSK* 差异表达, *BKI1* 被抑制。取表达量前三的 TFs (*MYB*, *AP2*, *bHLH*)与植物激素信号转导通路的基因进行 PPI 网络构建, 得到他们间的相互作用关系(图 4B)。将 PPI 结果导入 Cytoscape3.8.2 软件, 通过 MCC 算法和 Degree 算法得到排名前 10 的核心基因(图 4C)。结果显示, *TIR1* (Lba08g00069)的表达量最高, 是核心基因, *MYB15* (Lba06g00477)通过与 *IAA1* (Lba03g02895)、*IAA2* (Lba07g01906)、*ARF* (Lba06g02707)、*BRI1-3* (Lba01g00821)等基因互作进而参与枸杞不定根的形成。

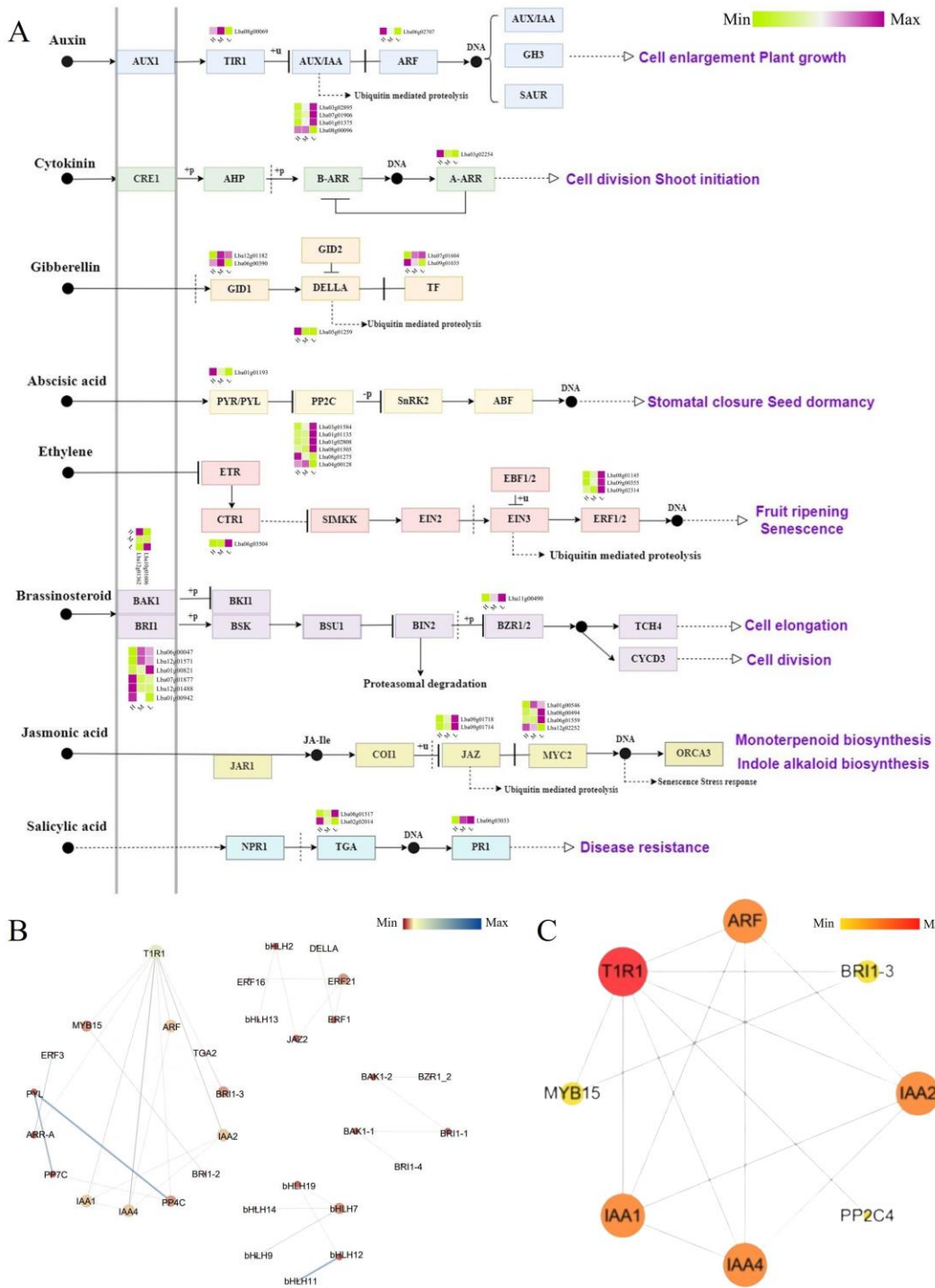


图 4 激素传导信号通路及关键基因网络图

(A) 激素传导信号通路图及相关基因热图; (B) 关键基因网络图; (C) 前十关键基因网络图

Figure 4 Hormone signaling pathways and key gene networks

(A) Hormone signaling pathway map and related gene network diagram; (B) Key gene network diagram; (C) Top ten key gene network diagram

### 2.7 不定根发生相关基因与生根指标相关性分析

将所有 hub 基因分别与不同品系之间做相关性分析, 如表 7 所示, Lba06g00107、POX40(Lba11g00692)与生根率显著相关; IAA4(Lba08g00096)、MYB15(Lba06g00477)、

*PP2C-4* (Lba08g01505)与生根效果指数相关性最强; *TIR1* (Lba08g00069)与平均根粗显著相关, *POX18* (Lba04g02547)与平均根长相关性最强。数量前三转录家族的相关转录因子在不同种质中的表达量不同(图 5)。bHLH7 在 H 中的表达量最高, 且与生根的相关指标呈正相关(表 7); MYB15 及 MYB19 在 L 中的表达量最高, 与除了生根率之外的其他指标呈负相关(表 7)。

表 7 通路 DEGs 与生根指标的相关性分析

Table 7 Correlation analysis of pathway DEGs with root formation indicators

	ARD	ARL	REI	RP
<i>ARF</i>	0.666	0.773	0.890	0.265
<i>bHLH7</i>	0.462	0.592	0.749	0.495
<i>BRI1-3</i>	-0.845	-0.917	-0.981	0.010
<i>CCR1</i>	0.316	0.166	-0.046	-0.968
<i>ERF21</i>	-0.395	-0.250	-0.039	0.986
<i>HCT1</i>	-0.361	-0.500	-0.672	-0.587
<i>IAA1</i>	-0.711	-0.811	-0.916	-0.205
<i>IAA2</i>	-0.852	-0.922	-0.983	0.022
<i>IAA4</i>	0.955	0.989	0.998*	-0.269
<i>Lba01g02094</i>	0.298	0.441	0.621	0.640
<i>Lba03g00273</i>	0.577	0.696	0.832	0.373
<i>Lba03g00908</i>	-0.111	0.043	0.254	0.895
<i>Lba04g01876</i>	0.647	0.757	0.878	0.289
<i>Lba05g00843</i>	0.429	0.563	0.725	0.526
<i>Lba06g00107</i>	-0.580	-0.448	-0.249	0.999*
<i>Lba06g00184</i>	0.436	0.569	0.730	0.520
<i>Lba06g00553</i>	0.517	0.642	0.790	0.439
<i>Lba08g00116</i>	0.231	0.378	0.565	0.692
<i>Lba12g02681</i>	-0.072	0.082	0.291	0.877
<i>MYB15</i>	-0.952	-0.988	-0.999*	0.260
<i>MYB19</i>	-0.877	-0.941	-0.991	0.073
<i>POX12</i>	-0.406	-0.260	-0.050	0.988
<i>POX18</i>	0.994	0.999*	0.967	-0.448
<i>POX21</i>	0.618	0.489	0.294	-0.996
<i>POX3</i>	0.181	0.028	-0.184	-0.924
<i>POX31</i>	0.995	0.968	0.893	-0.623
<i>POX40</i>	-0.604	-0.474	-0.277	0.998*
<i>PP2C-4</i>	-0.908	-0.962	-0.998*	0.141
<i>TIR1</i>	0.999*	0.979	0.914	-0.584
<i>UGT72E2</i>	-0.646	-0.755	-0.877	-0.291

RP 代表生根率; REI 代表生根效果指数; ARD 代表平均根粗; ARL 代表平均根长; \*表示显著相关

RP stands for rooting rate; REI stands for rooting effect index; ARD stands for average root thickness;

ARL stands for average root length; \* Indicates a significant correlation

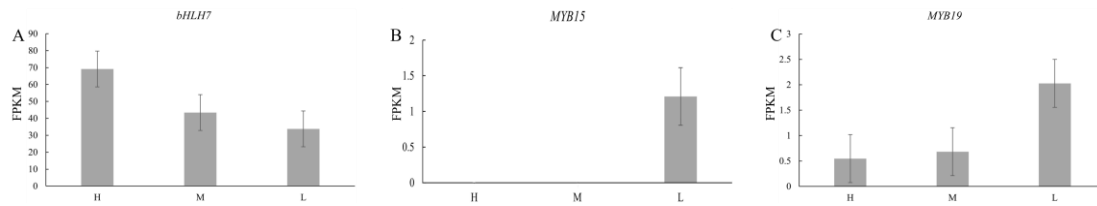


图 5 枸杞不定根发生相关转录因子的表达分析

Figure 5 Expression analysis of transcription factors related to adventitious root formation in *Lycium barbarum*

## 2.8 DEGs 的 qRT-PCR 分析

为了验证测序结果的可靠性,从 DEGs 中抽取 6 个候选关键基因进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测基因表达水平的变化,结果如图 6 所示,不同品系枸杞生根基因表达量变化趋势与转录组测序结果基本一致,表明转录组测序结果有较高的可靠性。

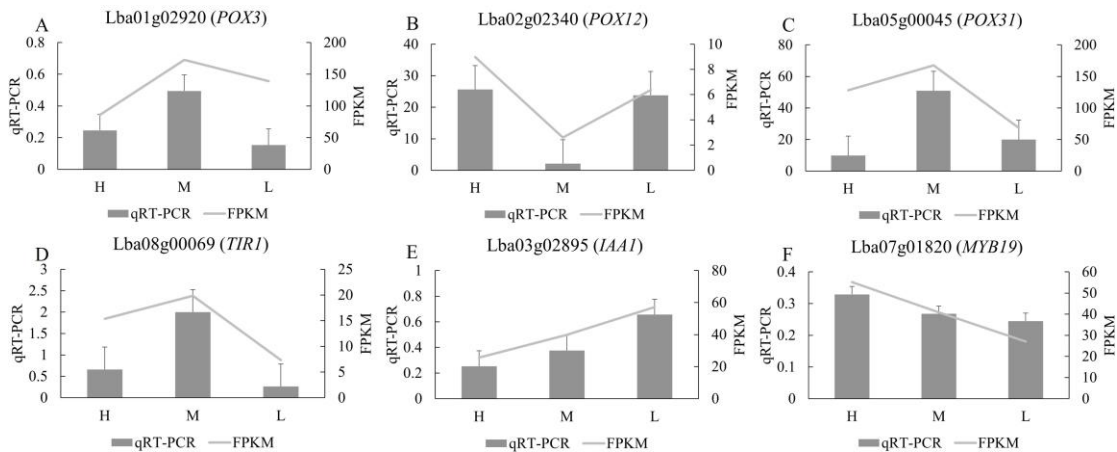


图 6 DEGs 的 qRT-PCR 分析

Figure 6 qRT-PCR analysis of DEGs

## 3 讨论

### 3.1 转录因子在不定根形成中的调控作用

不定根是植物在非正常生根部位,如茎、叶等处形成的根系,对于植物的营养繁殖、环境适应以及应对胁迫至关重要。而转录因子(transcription factor, TF)在不定根的起始、发育过程中扮演着关键的调控角色,通过调控基因的表达,影响植物激素信号通路、细胞命运决定等过程(Wang et al., 2024)。本研究鉴定出多个转录因子家族,其中 MYB、AP2/ERF 和 bHLH 家族的转录因子数量最多,且其表达模式因品系而异。例如, MYB19 (Lba07g01820) 在苯丙烷代谢通路中调控多个基因的表达,而 MYB15 (Lba06g00477)在植物激素信号转导通路中与多个生长素相关基因存在互作关系,此结果在多个研究中得到了验证。Fu 等(2023)发现转录因子 MYB、bHLH 等在黄山苦茶不定根发生中做出了重要贡献;蔡柯伟等(2022)在研究红豆杉的不定根形成时发现 AP2/ERF 和 bHLH 参与根发育及细胞分裂;许智宏等(2019)指出,拟南芥受机械损伤后,茉莉酸在伤口处的聚集成为启动不定根形成的“信号开关”,其通过诱导 ERF109 产生,并借助 ASA1 加速生长素积累,完成对不定根发育的

调控。这些结果表明, 转录因子通过精细调控基因表达网络, 影响不定根的形成和发育。此外, 不同品系枸杞中转录因子的差异表达可能与其生根能力的差异密切相关。未来研究可进一步通过基因编辑技术验证这些转录因子的功能, 以明确其在不定根发生中的具体作用。

### 3.2 苯丙烷代谢与植物激素信号转导通路基因参与不定根形成

不定根的形成是一个复杂的生物学过程, 受到多种激素的协同调控。有研究表明植物激素在不定根的形成过程中发挥重要作用(Zhang et al., 2023)。本研究通过转录组分析发现, 差异基因主要富集在苯丙烷通路及植物激素通路中, 其中生长素(auxin)信号通路中的关键基因 *TIR1* (Lba08g00069)和 *ARF* (Lba06g02707)在不同品系枸杞中表现出显著的差异表达, 且与生根率和生根效果指数高度相关, 而苯丙烷通路中的关键基因 *POX18* (Lba04g02547)与平均根长相关性最强。这与已有研究结果一致, 表明苯丙烷通路及植物激素通路可能在不定根诱导过程中起着核心作用(赵敏等, 2024), 且在拟南芥的研究中发现 *TIR1* 和 *ARF* 通过调控茉莉酸正向调控不定根的形成(Lakehal et al., 2019)。此外, 多种研究表明, 脱落酸(ABA)和油菜素甾醇(BR)在植物的生长发育和逆境响应中扮演着重要的角色, 尤其是在不定根(AR)的形成过程中(Zhao et al., 2024)。本研究发现脱落酸(ABA)和油菜素甾醇(BR)信号通路中的基因(如 *ABF*、*PP2C*、*BRI1* 等)也表现出显著的差异表达, 这表明多种激素的协同作用在枸杞不定根形成中不可或缺, 这与前人研究的结果一致。不同品系枸杞中, 虽然鉴定出的转录因子家族和激素信号通路基因相似, 但其表达模式存在显著差异, 这表明枸杞不定根形成过程中可能存在品系特异性的调控机制, 未来研究可进一步探索这些激素信号通路之间的互作关系, 以揭示其在不定根形成中的具体调控机制。

### 3.3 生根相关基因的功能与调控网络

本研究通过相关性分析和蛋白互作网络构建, 筛选出可能与枸杞不定根形成高度相关的基因。其中, *Lba06g00107* 和 *POX40* (Lba11g00692)与生根率相关性最强, *TIR1* (Lba08g00069)与平均根粗相关性最强。现有研究表明, *TIR1* 作为植物生长素受体, 在植物生长发育的多个方面起着重要作用, 包括根的形成和发育(Shu et al., 2018)。这些基因可能通过调控细胞分裂、伸长和分化等过程, 影响不定根的形成和发育。本研究还发现 *IAA4* (Lba08g00096)、*MYB15* (Lba06g00477)、*PP2C-4* (Lba08g01505)与生根效果指数相关性最强; 说明 *IAA* 与 *PP2C* 可能参与调控不定根的产生, 相似的结果在拟南芥不定根形成研究中也被发现(Song et al., 2024)。此外, 通过 PPI 网络分析和 Cytoscape 软件构建的调控网络显示, 转录因子与代谢通路基因之间也存在复杂的互作关系。综上, 通过共表达网络及相关性分析筛选到 *TIR1*、*MYB15* 等候选基因, 其表达趋势与生根指标高度相关, 其可能参与不定根的调控, 但当前缺乏遗传学证据, 未来应通过转基因等方法进行验证, 以明确它们在枸杞不定根形成中的具体作用。另外, 苯丙烷代谢通路中的 *POX18* (Lba04g02547)与平均根长相关性最强, 这在其他植物中尚未有类似报道, 这表明枸杞不定根形成过程中可能存在独特的代谢调控机制。本研究通过第 28 d 的转录组数据鉴定到与生根表型高度相关的基因, 这些基因的差异表达可能参与了根原基起始、发育及形成过程。未来需结合不定根不同

发育时间点的转录组或单细胞测序数据,进一步追踪根原基起始阶段的瞬时表达变化,以解析不定根发生的动态调控网络。

#### 4 结论

本研究通过水培和转录组测序技术,挖掘了枸杞不定根形成相关基因。结果表明,不定根的形成是一个由多基因协同调控的复杂过程。转录组分析鉴定出大量差异表达基因,其中 MYB、AP2/ERF 和 bHLH 家族的转录因子发挥关键作用。KEGG 通路分析发现,苯丙烷代谢通路和植物激素信号转导通路在枸杞不定根形成过程中较为关键, *MYB19* (Lba07g01820) 与 *POX* 基因, *TIR1* (Lba08g00069) 与 IAA 和 ARF 等基因互作。生根相关指标受不同基因调控, Lba06g00107 和 *POX40* (Lba11g00692) 与生根率的相关性最强, *TIR1* (Lba08g00069) 与平均根粗的相关性最强。研究结果为了解枸杞不定根形成的分子机制提供了重要依据,对枸杞遗传改良具有重要意义。

#### 作者贡献声明

杨改儿: 实验设计、操作及数据采集与分析,撰写论文初稿;张璇: 协助实验操作;王嘉栋: 实验技术指导及文章讨论;张波和段淋渊: 协助分析数据;李翔: 实验方案设计规划,参与文章讨论及修订。

## 参考文献

- Ángeles MR, Ivan F, Victora MA, Salguero JL** (2022). Auxin-Cytokinin Balance Shapes Maize Root Architecture by Controlling Primary Root Elongation and Lateral Root Development. *Frontiers in Plant Science* 13836592-836592.
- Cai KW, Zhang DD, Li X, Zhang QH, Jiang LP, Li YX, Song RX, Sun SQ, Guo RX, Han R, Hu XQ, Zhou XD, Pei XN, Zhao XY** (2022). Exogenous phytohormone application and transcriptome analysis provides insights for adventitious root formation in *Taxus cuspidata* S. et Z. *Plant Growth Regulation* 100(1): 33-53.
- Chi L X, Xie Z P, Feng R, Due XQ, Lu XY, Fan WQ, Gao H, Yue SJ, Zheng R** (2025). Comparative transcriptome analysis of *Lycium barbarum* in response to *Fusarium solani* stress. *Molecular plant breeding* 1-33.
- 池礼鑫, 谢志鹏, 冯睿, 杜雪倩, 卢晓悦, 范文强, 高寒, 岳思君, 郑蕊 (2025). 宁夏枸杞响应腐皮镰刀菌胁迫的比较转录组分析. *分子植物育种* 1-33.
- Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R** (2020). TBtools: A Toolkit for Biologists Inheriting from R and Supporting a Series of Biological Data Analyses. *Molecular Plant* 13(8): 1194-1206.
- Dutta D, Sharma V, Guria S, Chakraborty S, Sarveswaran S, Harshavardhan D, Roy P, Nandi S, Thakur A, Kumar S, Sonar SS, Khadka N, Lakshmi M, Shah Md. N.S.** (2023). Optimizing Plant Growth and Crop Productivity through Hydroponics Technique for Sustainable Agriculture: A Review. *International Journal of Environment and Climate Change* 13(9): 933–940.
- Fu H, Wei X, Chen Q, Yong SY, Liu QJ, Dang JB, Wu D, Liang GL, Guo QG** (2023). Comparative transcriptome analysis of molecular mechanisms underlying adventitious root developments in Huangshan Bitter tea (*Camellia gymnogyna* Chang) under red light quality. *Frontiers in plant science* 141154169-1154169.
- Hu JX, Chen YX, Yu MF, Zheng BS, Yan DL** (2024). Advances in physiological and molecular regulation mechanisms of adventitious root formation in plants. *Molecular plant breeding* 22(18): 6151-6159.
- 扈嘉鑫, 陈宇熙, 余敏芬, 郑炳松, 闫道良 (2024). 植物不定根生成的生理及分子调控机制研究进展. *分子植物育种* 22(18): 6151-6159.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL** (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12(4): 357-360.
- Lakehal A, Chaabouni S, Cavel E, Le Hir R, Ranjan A, Raneshan Z, Novák O, Păcurar DI, Perrone I, Jobert F, Gutierrez L, Bakò L, Bellini C** (2019). A Molecular Framework for the Control of Adventitious Rooting by TIR1/AFB2-Aux/IAA-Dependent
- © 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

Auxin Signaling in Arabidopsis. *Molecular Plant* 12(11): 1499-1514.

**Lee HW, Cho C, Pandey SK, Park Y, Kim MJ, Kim J.** (2019). LBD16 and LBD18 acting downstream of ARF7 and ARF19 are involved in adventitious root formation in Arabidopsis, *BMC Plant Biol* 19(1): 46.

**Li KP** (2014). Cloning and expression of AP2-like gene related to adventitious root induction and rooting in hybrid larch tissue culture. Master 's thesis. Beijing: China Academy of Forestry Sciences, pp.1-134.

**李魁鹏** (2014). 杂种落叶松组培不定根诱导及生根相关 AP2-like 基因的克隆与表达研究. 硕士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院 pp. 1-134.

**Liu R, Wen SS, Sun TT, Wang R, Zuo WT, Yang T, Wang C, Hu JJ, Lu MZ, Wang LQ** (2022). PagWOX11/12a positively regulates the *PagSAUR36* gene that enhances adventitious root development in poplar. *Journal of Experimental Botany* 73(22), 7298–7311.

**Liu XX, Fan WQ, Jiao HH, Gao H, Tang JN, Zhu JZ, Yue SJ, Zheng R** (2023). Analysis of differentially expressed genes in the synthesis of active components in fruits of different varieties of Lycii Fructus in Ningxia based on transcriptome sequencing. *Biological Engineering Journal* 39(07): 3015-3036.

**刘雪霞, 范文强, 焦慧慧, 高寒, 唐建宁, 朱金忠, 岳思君, 郑蕊** (2023). 基于转录组测序的宁夏枸杞不同品种果实活性成分合成差异表达基因分析. *生物工程学报* 39(07):3015-3036.

**Love MI, Huber W, Anders S** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550.

**Rukeya J, Sun YJ, Zhong LZ, Shen Y, Ye XQ** (2013). Research Progress on Phytochemical Composition and Biological Activities of Goji Berry. *Chinese Journal of Food Science* 13(08): 161-172.

**如克亚·加帕尔, 孙玉敬, 钟烈州, 沈妍, 叶兴乾** (2013). 枸杞植物化学成分及其生物活性的研究进展. *中国食品学报* 13(08):161-172.

**Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T** (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* 13(11): 2498-2504.

**Shi X** (2020). transcription factor HY5 regulates the formation of adventitious roots and callus and shoot regeneration in Arabidopsis thaliana. Master 's thesis. Shaanxi: Shaanxi Normal University, pp.1-91

**师雄** (2020). 转录因子 HY5 调控拟南芥不定根和愈伤组织形成以及芽再生的研究. 硕

士论文. 陕西: 陕西师范大学 pp. 1-91.

**Shu WB, Zhou HJ, Jiang C, Zhao ST, Wang LQ, Li QZ, Yang ZQ, Groover A, Lu MZ** (2018). The auxin receptor TIR1 homolog (PagFBL 1) regulates adventitious rooting through interactions with Aux/IAA28 in *Populus*. *Plant Biotechnology Journal* 17(2): 338–349.

**Song XB, Huang RM, Liu H, Zhang JP, Chang YY, Pei D** (2024). Transcriptome profiling of indole-3-butyric acid–induced adventitious root formation in softwood cuttings of walnut. *Horticultural Plant Journal* 10(6): 1336–1348.

**Sun XL, Yang CT, Hu YN, Zou XH** (2021). Research progress on rooting mechanism of plant cuttings. *Journal of Agronomy* 11 (10): 33-40.

孙雪莲, 杨楚童, 胡亚楠, 邹显花 (2021). 植物扦插生根机理的研究进展. *农学学报* 11(10): 33-40.

**Wang H, Ba G, Uwamungu J Y, Ma WJ, Yang LN** (2024). Transcription Factor MdPLT1 Involved Adventitious Root Initiation in Apple Rootstocks. *Horticulturae* 10(1): 64.

**Wang JD, Zhao JH, Ma XM, Yang GE, Duan LY** (2024). Comparative Analysis of Rooting Ability of Different *Lycium barbarum* Cuttings and Hydroponics. *Economic Forest Research* 42(01): 140-149.

王嘉栋, 赵佳慧, 马西梅, 杨改儿, 段淋渊 (2024). 不同枸杞扦插及水培生根能力比较分析. *经济林研究* 42(01): 140-149.

**Wang YX, Li JY, Hu TT** (2024). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycii Fructus*. *Guangzhou Chemical Industry* 52(24): 1-4.

王雨心, 李金洋, 胡婷婷 (2024). 枸杞子化学成分和药理作用研究进展. *广州化工* 52(24): 1-4.

**Wei SJ** (2024). gene transcription dynamics and key gene mining during adventitious root formation in citrus. Master 's thesis. Hubei: Huazhong Agricultural University, pp.1-71

魏斯佳 (2024). 柑橘不定根发生过程的基因转录动态与关键基因挖掘. 硕士学位论文. 湖北: 华中农业大学 pp. 1-71.

**Wu WQ, Hu ZJ, Shen SY, Zhang GF, Lin JX, Zhang X** (2025). Research progress on hormone regulation related to adventitious root regeneration and cutting rooting of plants. *Plant research* 1-15.

吴卫倩, 胡子建, 沈诗雅, 张贵芳, 林金星, 张曦 (2025). 植物不定根再生与扦插生根相关激素调控研究进展. *植物研究* 1-15.

**Xu ZH, Zhang X.S, Su YH, Hu YX, Xu L, Wang JW** (2019). Plant cell totipotency and regeneration, *Zhongguo Kexue: Shengming Kexue (Scientia Sinica: Vitae)*,

49(10):1282-1300.

许智宏, 张宪省, 苏英华, 胡玉欣, 徐麟, 王佳伟 (2019). 植物细胞全能性和再生, 中国科学: 生命科学 49(10): 1282-1300.

**Yuan JL, Li Y, Luo YW, Xuan YH, He NJ (2025).** Evaluation of cutting growth and rooting ability of different mulberry varieties. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)* 47(02): 61-69.

袁姜莲, 李炎, 罗义维, 轩亚辉, 何宁佳 (2025). 不同桑树品种扦插生长情况及其生根能力评价. *西南大学学报(自然科学版)* 47(02): 61-69.

**Zhang Q, Shi M, Tang F, Su N, Jin FY, Pan YN, Chu LW, Lu MZ, Shu WB, Li JC (2023).** Transcriptome Analysis Reveals the Hormone Signalling Coexpression Pathways Involved in Adventitious Root Formation in *Populus*. *Forests* 14(7): 1436.

**Zhang PD, Lv YN, Zhang RX, Wang HL, Jin H (2025).** Effects of exogenous hormones on rooting, physiology and biochemistry of softwood cuttings of *Elaeagnus angustifolia*. *Journal of Northeast Forestry University* 53(04): 79-87.

张鹏迪, 吕艳娥, 张仁雪, 王慧吕, 晋慧 (2025). 外源激素对沙枣嫩枝扦插生根及生理生化的影响. *东北林业大学学报* 53(04): 79-87.

**Zhang YL, Lin X, Wu Y, Li MJ, Zhang SJ, Lu M, Rao YC, Wang YX (2020).** Research progress on rice root genetic breeding. *Acta Botanica* 55 (03): 382-393.

章怡兰, 林雪, 吴仪, 李梦佳, 张晟婕, 路梅, 饶玉春, 王跃星 (2020). 水稻根系遗传育种研究进展. *植物学报* 55(03): 382-393.

**Zhao K, Feng R, Manda T, Liu S, Zheng R, Yang L M (2025).** Genomic Survey and Characterization of 14-3-3 Genes in *Lycium barbarum L.* and Its Expression Patterns Responding to Infection of *Fusarium solani*. *Tropical Plant Biology* 18(1): 34-34.

**Zhao M, Lei Y, Wu L, Qi HR, Song ZH, Xu M (2024).** The miR159a - PeMYB33 module regulates poplar adventitious rooting through the abscisic acid signal Pathway. *The Plant Journal* 118(3): 879-891.

**Zhao M, Liu K, Wang Y, Hu Q, Di DL, Pei D, Lu B (2024).** Transcriptome analysis of adventitious root formation in olive strips. *Western Forestry Science* 53(03): 68-77.

赵敏, 刘坤, 王毅, 胡青, 邸多隆, 裴栋, 陆斌 (2024). 油橄榄压条不定根发生的转录组分析. *西部林业科学* 53(03): 68-77.

# Comparative Analysis of Transcriptome of Adventitious Roots under Different Hydroponic Conditions of *Lycium barbarum*

Yang Gaier<sup>1,2</sup>, Zhang Xuan<sup>1,2</sup>, Wang Jiadong<sup>1,2</sup>, Zhang Bo<sup>3</sup>, Duan Linyuan<sup>3</sup>, Li Xiang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Forestry and Prataculture, Ningxia University, Yinchuan 750021; <sup>2</sup>National Key

Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, Yinchuan 750021; <sup>3</sup>*Lycium barbarum*

Research Institute of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750026

**INTRODUCTION:** *Lycium barbarum* is an important economic forest tree species, and its cutting propagation efficiency is closely related to the formation of adventitious roots. However, the molecular mechanism of adventitious root formation is not clear, which restricts the large-scale breeding and efficient utilization of *Lycium barbarum*.

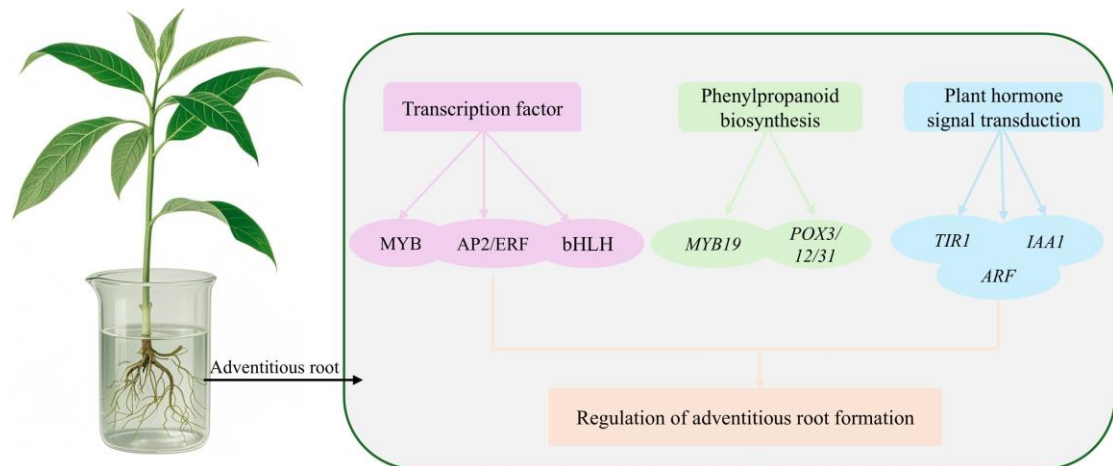
**RATIONALE:** In order to explore the transcriptome differences in adventitious root formation of *Lycium barbarum*, three wolfberry genotypes with different root-forming abilities were used as experimental materials. A hydroponic experiment was conducted to analyze the transcriptional differences during adventitious root formation.

**RESULTS:** Transcriptome sequencing identified 6448 differentially expressed genes (DEGs), with the L-vs-H group having the highest number of DEGs at 4413, including 2583 upregulated and 1830 downregulated genes. A total of 281 transcription factors were identified, mainly from the MYB, AP2/ERF, and bHLH families, with distinct expression patterns. GO enrichment analysis revealed that 1714 DEGs were enriched in 32 GO terms. KEGG enrichment analysis indicated that DEGs were mainly enriched in the phenylpropanoid biosynthesis and plant hormone signal transduction pathways. Among these, MYB19 (Lba07g01820) is a core gene in the phenylpropanoid pathway, and TIR1 (Lba08g00069) is a core gene in the plant hormone signal transduction pathway. Both genes play crucial roles in adventitious root formation in wolfberry. qRT-PCR validated the reliability of the transcriptome data.

**CONCLUSION:** In this study, the transcriptional regulatory network of adventitious root formation in *Lycium barbarum* was analyzed for the first time, which provided new insights into the root development mechanism of woody plants, revealed the molecular mechanism

of adventitious root formation in *Lycium barbarum*, and laid an important theoretical foundation for genetic improvement and efficient breeding of *Lycium barbarum* and other woody plants.

**Key words** wolfberry, hydroponics, adventitious roots formation, transcriptomics, key genes



**Schematic diagram of transcriptomic analysis of adventitious root generation under hydroponics of *Lycium barbarum***

### 通讯作者简介

**李翔**, 宁夏大学林业与草业学院副教授, 硕士生导师。硕士和博士分别毕业于北京林业大学和东北林业大学林学专业, 现就职于宁夏大学林业与草业学院。主要从事林木诱变育种、倍性育种、林木高效栽培、林木环境响应分子机制等研究。主持宁夏重点研发计划(引才专项)项目、宁夏自然科学基金(优秀青年)项目、横向项目等多项; 专利 2 项; 指导研究生和大学生创新创业项目。申请人近 5 年在 *Gigascience*、*Plant Physiology*、*Industrial Crops and Products*、*Plant Science*、*Frontiers in Plant Science* 等国际学术期刊上发表 SCI 论文 16 篇, 其中以第一作者或通讯作者发表论文 12 篇。