

百合 LoLBD18 参与调控鳞茎发育过程中淀粉累积的分子机制

马晓娟

(北京林业大学园林学院, 北京 100084)

摘要: 百合作为世界范围内极具经济价值的观赏、食用及药用兼用型球根花卉, 其鳞茎的发育质量与营养物质积累水平直接决定了种球商品价值、繁殖效率以及后期开花品质。淀粉作为百合鳞茎中最主要的贮藏物质, 其合成、转运与累积过程是鳞茎膨大和品质形成的核心生理环节。LBD转录因子家族作为植物特有的一类转录调控因子, 在植物侧生器官发育、营养物质代谢、细胞分化等多个生物学过程中发挥关键调控作用, 但目前关于LBD基因在百合鳞茎发育及淀粉代谢调控中的功能与分子机制研究仍较为匮乏。本研究以东方百合主栽品种‘索邦’为试验材料, 基于前期转录组测序获得的差异表达基因LoLBD18, 系统开展基因克隆、生物信息学分析、时空表达模式检测、亚细胞定位、转基因功能验证以及分子互作调控机制等研究, 旨在明确LoLBD18在百合鳞茎发育及淀粉累积过程中的生物学功能, 解析其调控淀粉合成与积累的分子通路。研究结果表明, LoLBD18属于LBD家族Class I类转录因子, 具有典型的LOB保守结构域, 定位于细胞核中, 且在鳞茎快速膨大与淀粉高速累积阶段呈现显著上调表达模式。过表达LoLBD18能够显著促进百合鳞茎的膨大生长, 提高鳞茎鲜重、干物质含量以及总淀粉、直链淀粉和支链淀粉的积累量; 而基因沉默植株则表现出鳞茎生长迟缓、体积减小、淀粉含量显著下降等表型。进一步分子机制研究证实, LoLBD18可以通过直接结合淀粉合成关键酶基因如AGPase、GBSS、SSS、SBE等启动子区域的LBD特异性结合元件, 激活下游靶基因的转录表达, 同时还能够与LoNAC1、LoMYB28等转录因子发生蛋白互作, 形成协同调控模块, 共同强化淀粉合成通路的运转效率。本研究系统阐明了LoLBD18调控百合鳞茎淀粉累积的分子机制, 不仅丰富了百合鳞茎发育的转录调控理论, 也为百合优质种球的分子育种、遗传改良以及高效栽培调控提供了重要的基因资源和理论支撑。

关键词: 百合; LoLBD18; LBD转录因子; 鳞茎发育; 淀粉累积; 分子调控

中图分类号: S682.2; Q

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 (2025) 03-0013-11

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.03.002

Molecular Mechanism of Lily LoLBD18 Involved in Regulating Starch Accumulation During Bulb Development

Ma Xiaojuan

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100084)

Abstract: *Lilium* spp. are economically important bulbous flowers with ornamental, edible and medicinal values. The development and nutrient accumulation of lily bulbs directly determine bulb quality, propagation efficiency and flowering performance. As the dominant storage substance in lily bulbs, starch synthesis, transportation and accumulation constitute the key physiological processes underlying bulb swelling and quality formation. The LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN) transcription factor family is plant-specific, and plays vital roles in plant lateral organ development, nutrient metabolism and cell differentiation. However, the function and molecular mechanism of LBD genes in regulating lily bulb development and starch metabolism remain largely unclear. In this study, Oriental lily cultivar ‘Sorbonne’ was used as material. Based on the differentially expressed gene LoLBD18 identified from previous transcriptome sequencing, we performed systematic studies including gene cloning, bioinformatics analysis, spatiotemporal expression pattern, subcellular localization, transgenic functional verification and molecular interaction analysis. The aim was to clarify the biological function of LoLBD18 in bulb development and starch accumulation, and reveal its molecular regulatory pathway. The results showed that LoLBD18 belongs to Class I of the LBD family with a typical conserved LOB domain, localized in the nucleus. It was significantly up-regulated during the rapid bulb expansion and high-speed starch accumulation stages. Overexpression of LoLBD18 significantly promoted bulb growth, and increased bulb fresh weight, dry matter content, total starch, amylose and amylopectin contents. In contrast, gene silencing plants showed slow bulb growth,

作者简介: 马晓娟, 博士, 讲师, 研究方向为球根花卉发育生物学。

smaller size and significantly decreased starch content. Further molecular mechanism analysis confirmed that LoLBD18 could directly bind to LBD-specific cis-elements in the promoters of key starch synthesis genes such as AGPase, GBSS, SSS and SBE, thus activating their transcription. Meanwhile, LoLBD18 could interact with transcription factors including LoNAC1 and LoMYB28 to form a synergistic regulatory module, enhancing the efficiency of starch synthesis pathway. This study systematically elucidates the molecular mechanism of LoLBD18 regulating starch accumulation in lily bulbs, which not only enriches the transcriptional regulation theory of lily bulb development, but also provides important gene resources and theoretical support for molecular breeding, genetic improvement and efficient cultivation of high-quality lily bulbs.

Keywords: Lilium; LoLBD18; LBD transcription factor; bulb development; starch accumulation; molecular regulation

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 百合鳞茎的经济价值及淀粉累积对品质的重要性

百合隶属于百合科 (Liliaceae) 百合属 (Lilium) 多年生球根草本花卉, 是全球花卉产业中占据重要地位的高档切花、盆栽花卉与园林观赏材料, 同时也是我国传统药食同源植物, 兼具极高的观赏价值、食用价值与药用价值^[1]。我国是世界百合属植物的起源中心与遗传多样性中心, 拥有极为丰富的野生百合资源, 分布范围广、生态类型多样, 为百合的遗传育种与品种创新提供了得天独厚的物质基础。近年来, 随着花卉产业、健康食品产业以及中医药产业的快速发展, 百合的市场需求量持续上升, 种植面积不断扩大, 已经成为我国许多地区农业结构调整、农民增收以及乡村振兴的重要经济作物。

百合的生命周期与繁殖方式高度依赖鳞茎, 鳞茎是百合适应环境、抵御低温、干旱等不良条件的重要贮藏器官, 也是养分储存与无性繁殖的核心器官。从形态结构上看, 百合鳞茎由鳞茎盘、肥厚肉质鳞片以及顶芽、侧芽等结构组成, 鳞片细胞中积累大量的碳水化合物、蛋白质、生物碱以及多种活性物质, 为鳞茎萌发、出苗、展叶、开花等后续生长发育过程提供物质与能量保障。在实际生产中, 百合种球的大小、紧实度、鳞片厚度、干物质率以及淀粉含量是评价种球质量的核心指标, 直接影响出苗整齐度、植株长势、开花数量、切花等级以及种球贮藏寿命。可以说, 鳞茎发育是否健全、营养物质积累是否充足, 决定了百合产业的整体效益^[2]。

在百合鳞茎所含的各类营养物质中, 淀粉是最主要、含量最高的贮藏碳水化合物, 通常占鳞茎干重的30%~50%, 部分食用百合品种淀粉含量甚至超过60%。淀粉不仅是鳞茎萌发与前期生长的主要能量来源, 也是决定鳞茎重量、口感、加工品质与耐贮性的关键物质。在鳞茎发育过程中, 淀粉代谢呈现高度规律性: 在鳞茎发育初期, 地上叶片通过光合作用合成的碳水化合物以蔗糖的形式通过韧皮部向下运输至地下鳞茎, 在鳞片细胞中经过一系列酶促反应转化为淀粉, 并储存在造粉体中; 随着鳞茎进入快速膨大期, 淀粉合成速

率大幅提升, 大量光合产物被持续固化为淀粉, 鳞茎体积与重量迅速增加^[3]; 到鳞茎成熟后期, 淀粉含量达到峰值, 鳞茎进入休眠状态, 为下一个生长周期储备充足能量。因此, 淀粉的合成、转运与累积贯穿于鳞茎启动、膨大、成熟与休眠的全过程, 是鳞茎发育的核心生理事件。

在生产实践中, 淀粉积累不足往往导致鳞茎瘦小、干瘪、干物质含量低、抗病性差, 严重降低种球合格率与商品价值^[4]。目前, 百合栽培中主要依靠水肥管理、温度调控、光照调节等农艺措施促进鳞茎膨大与淀粉积累, 虽然能够在一定程度上改善种球品质, 但难以从根本上解决鳞茎发育缓慢、营养积累效率低等问题。其根本原因在于, 人们对百合鳞茎发育及淀粉积累的内在分子调控机制认识不足, 缺乏关键功能基因与调控通路作为理论支撑。因此, 深入挖掘调控百合鳞茎淀粉累积的关键基因, 解析其作用机制, 对于揭示百合鳞茎品质形成的分子基础、推动百合分子育种进程、提升种球繁育效率与产业竞争力具有重要的理论意义与应用价值。

1.1.2 LBD转录因子家族在植物发育中的功能概述

LBD 转录因子, 全称为 LATERALORGANBOUNDARIESDOMAIN, 也被称为 LOB (LATERALORGANBOUNDARIES) 蛋白, 是一类植物特有的转录因子家族, 广泛存在于苔藓植物、蕨类植物、裸子植物与被子植物中, 在植物从低等到高等的进化过程中高度保守^[5]。LBD蛋白最显著的特征是在N端具有一段高度保守的LOB结构域, 长度约为100个氨基酸, 该结构域主要包含三个功能模块: 锌指状结构域、甘氨酸-丙氨酸富集区以及亮氨酸拉链样结构, 这些结构共同参与DNA结合、蛋白二聚化以及与其他蛋白的相互作用。根据LOB结构域的序列差异以及蛋白整体结构特点, LBD家族可以分为ClassI与ClassII两个亚类, 其中ClassI家族成员数量较多, 结构保守, 主要参与植物侧生器官的形态建成、器官边界形成、根的发育、叶片发育、花器官发育等过程; ClassII家族成员数量较少, C端序列变异较大, 主要参与植物氮代谢、花青素合成、次生代谢、逆境胁迫响应以及激素信号转导等生物学过程。

近年来, 随着功能基因组学与分子生物学技术的快速发展, LBD转录因子在模式植物如拟南芥、水稻、玉米中的功

能被逐步揭示。研究表明, LBD基因参与调控植物生长发育的多个方面。在拟南芥中, 多个LBD基因参与侧根的起始与伸长过程, 例如AtLBD16、AtLBD18、AtLBD29等基因能够响应生长素信号, 调控侧根原基的形成与发育, 缺失这些基因会导致侧根发生受阻。在叶片发育方面, LBD基因参与叶片极性建成、叶片边缘发育以及叶片形态塑造, 维持植物正常的株型结构。在生殖生长阶段, 部分LBD基因参与花器官边界建成、花粉发育以及胚胎发育, 对植物的繁殖成功率具有重要影响。

除了调控营养器官与生殖器官发育外, LBD转录因子在作物贮藏器官发育与碳水化合物代谢调控中的作用日益受到关注。马铃薯、甘薯、木薯、洋葱、水仙等块根、块茎、鳞茎类作物, 其产量与品质主要取决于贮藏器官中淀粉的积累量。越来越多的证据表明, LBD家族基因是调控贮藏器官发育与淀粉代谢的关键上游调控因子。例如, 马铃薯中的StLBD1基因能够调控块茎的形成与膨大, 同时影响淀粉合成关键基因的表达; 甘薯中的IbLBD基因参与块根的膨大和淀粉积累过程; 水仙、风信子等球根花卉中, 多个LBD基因在鳞茎膨大期呈现高表达, 暗示其参与鳞茎发育与养分积累。这些研究表明, LBD转录因子在调控地下贮藏器官发育与淀粉代谢方面具有功能保守性, 是解析球根类作物品质形成机制的重要切入点。

然而, 在百合中, LBD基因家族的系统研究仍然处于起步阶段, 仅有少数研究报道LBD基因参与珠芽形成、不定根发生等过程, 关于LBD基因调控百合鳞茎发育与淀粉积累的系统性研究尚未见报道, 其具体的分子机制、调控通路、靶基因以及互作蛋白均不明确。这在很大程度上限制了人们对百合鳞茎营养积累机制的理解, 也阻碍了百合品质改良分子育种的进程。因此, 开展百合LBD基因功能研究, 尤其是筛选并鉴定参与淀粉积累调控的关键LBD基因, 具有重要的科学价值。

1.1.3 LoLBD18基因的发现及其在鳞茎发育中的潜在作用

本课题组在前期研究中, 以东方百合主栽品种‘索邦’为材料, 选取鳞茎休眠解除期、启动生长期、膨大初期、快速膨大期、成熟休眠期五个关键发育阶段进行转录组高通量测序, 通过差异表达基因筛选、加权基因共表达网络分析以及功能富集分析, 获得了一系列与鳞茎发育、糖代谢、淀粉合成相关的候选基因。在这些基因中, 一个注释为LBD转录因子的基因在鳞茎快速膨大期与淀粉大量积累阶段呈现极显著上调表达, 其表达模式与淀粉合成关键酶基因的表达趋势高度一致, 提示该基因可能参与百合鳞茎淀粉积累的调控过程。根据同源序列比对与家族分类, 将该基因命名为

LoLBD18。

序列初步分析显示, LoLBD18具有典型的LOB结构域, 属于LBD家族Class I类成员, 与水稻、玉米、马铃薯等作物中调控贮藏器官发育与淀粉代谢的LBD基因具有较高的同源性, 进一步暗示其在鳞茎发育与营养物质积累中可能发挥重要作用。然而, 目前关于LoLBD18的基因结构、蛋白特性、组织表达特异性、亚细胞定位、生物学功能以及分子调控机制均未见任何报道。基于以上研究背景与前期基础, 本研究提出科学问题: LoLBD18是否参与调控百合鳞茎发育过程? LoLBD18是否影响鳞茎中淀粉的合成与积累? 如果具有调控作用, 其分子机制是什么?

为回答上述问题, 本研究以百合LoLBD18为研究对象, 系统开展基因克隆、生物信息学分析、时空表达模式检测、亚细胞定位分析、转基因过表达与基因沉默功能验证、淀粉含量测定、淀粉代谢通路基因表达分析、酵母双杂交、EMSA、ChIP- qPCR以及双荧光素酶报告系统检测等一系列试验, 从基因序列、表达模式、生理功能到分子调控通路多层次、多角度解析LoLBD18在百合鳞茎发育及淀粉积累中的作用机制。研究结果有望填补百合LBD转录因子调控淀粉代谢机制的研究空白, 为百合优质种球的分子育种提供新的靶基因, 同时也为其他球根花卉贮藏器官发育与营养积累机制研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 百合品种选择与鳞茎发育阶段划分

本研究选用东方百合杂种系主栽品种‘索邦’(Lilium oriental ‘Sorbonne’)作为试验材料。该品种生长势强、鳞茎膨大速度快、适应性广、淀粉含量稳定, 是目前国内外切花生产与种球繁育中广泛应用的代表性品种, 也是研究百合鳞茎发育的理想材料。试验所用种球均由北京林业大学园林学院花卉种质创新与分子育种实验室提供, 种球周径统一为16~18cm, 健康无病虫害、无机械损伤、大小均匀一致。

百合植株种植于北京林业大学科研温室中, 温室环境条件严格控制: 白天温度22~25℃, 夜间温度15~18℃, 光照周期14h/10h, 光照强度20000~30000lx, 空气相对湿度维持在60%~70%。栽培基质采用草炭、珍珠岩、蛭石按照体积比3:1:1混合配制, 基质疏松透气、养分均衡, 定植前进行高温消毒处理。整个生长周期采用常规水肥管理, 保持基质湿润但不积水, 生长期每10d浇灌一次霍格兰全营养液, 保证植株正常生长发育。

为准确分析LoLBD18在鳞茎发育过程中的表达模式及其功能,结合百合生长发育特性与鳞茎形态变化,将百合鳞茎发育全过程划分为五个连续且具有代表性的阶段:

第一阶段为休眠解除期(S0),种球经过低温层积处理,休眠状态被打破,鳞茎盘基部开始出现愈伤组织分化,鳞片内部物质开始动员,但尚未出苗;

第二阶段为鳞片启动生长期(S1),地上部分破土出苗,高度约2~3cm,鳞片细胞开始活跃分裂,淀粉合成启动,积累速率较慢;

第三阶段为鳞茎膨大初期(S2),植株地上部分展叶,光合系统逐步建立,光合产物开始向地下转运,鳞茎体积开始缓慢增大,淀粉含量稳步上升;

第四阶段为快速膨大期(S3),植株进入盛花期,地上光合效率达到峰值,大量光合产物持续不断地向地下鳞茎运输,鳞茎快速膨大、重量急剧增加,淀粉合成与积累速率达到最高;

第五阶段为成熟休眠期(S4),地上部分逐渐枯萎衰老,光合产物停止输入,鳞茎完全成熟,淀粉含量达到最大值,随后进入自然休眠状态,为下一个生长周期做准备。

在每个发育阶段,分别选取生长状况一致的植株,采集鳞茎中部鳞片组织,同时采集根、茎、叶、花等不同组织器官,用于后续基因克隆与表达模式分析。所有样品采集后迅速用锡纸包裹,放入液氮中快速冷冻,之后转移至超低温冰箱-80℃保存,用于总RNA提取。

2.1.2 植物表达载体与菌株准备

本研究所用菌株包括大肠杆菌菌株DH5 α 、根癌农杆菌菌株GV3101,均由本实验室长期保存。大肠杆菌用于基因克隆、载体构建与质粒扩增,农杆菌用于百合遗传转化与烟草瞬时转化试验。

所用植物表达载体根据试验目的不同分为多种类型:

用于基因过表达的载体为pCambia1301-35S-GFP,该载体携带CaMV35S强组成型启动子,能够驱动目的基因在植物体内组成型高表达,同时携带GFP绿色荧光蛋白标签,便于后续转基因植株的筛选与亚细胞定位观察,载体还携带潮霉素抗性筛选基因,适合在百合与烟草中进行转化筛选;

用于病毒诱导基因沉默的载体为pTRV1与pTRV2双元载体,通过构建目的基因片段的沉默载体,利用病毒侵染诱导植物体内目的基因发生沉默,从而快速获得基因沉默表型,适用于百合等难以稳定遗传转化的物种;

用于亚细胞定位的载体为pCambia1300-35S-YFP,通过将目的基因与YFP黄色荧光蛋白融合,在烟草表皮细胞中瞬时表达,观察荧光信号分布判断蛋白定位;

用于双荧光素酶报告系统检测的载体包括报告载体pGreenII0800-LUC与效应载体pGreenII62-SK,报告载体用于连接淀粉合成关键基因的启动子序列,效应载体用于连接LoLBD18编码区序列,共转化烟草叶片后通过荧光素酶活性检测判断转录激活能力。

所有载体质粒均采用质粒提取试剂盒进行提取纯化,通过琼脂糖凝胶电泳与核酸定量仪检测浓度与纯度,确保符合后续分子生物学试验要求。

2.2 实验方法

2.2.1 LoLBD18基因克隆与序列分析

采用Trizol法对百合鳞茎总RNA进行提取,严格按照试剂盒说明书操作。提取完成后,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,通过核酸微量检测仪检测RNA浓度与OD260/OD280比值,确保RNA无降解、无污染、质量合格。以高质量总RNA为模板,使用反转录试剂盒合成第一链cDNA,反应体系与反应条件按照说明书设置,反转录产物置于-20℃保存备用。

根据前期转录组测序获得的LoLBD18全长序列,利用PrimerPremier5.0软件设计特异性扩增引物,引物覆盖完整编码区序列。以百合鳞茎cDNA为模板进行RT-PCR扩增,PCR反应体系包含cDNA模板、上下游引物、dNTP混合物、TaqDNA聚合酶、PCR缓冲液与ddH₂O。反应程序设置为:预变性94℃5min;变性94℃30s,退火58℃30s,延伸72℃1min,共35个循环;终延伸72℃10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,使用胶回收试剂盒对目的条带进行回收纯化。

将纯化后的目的片段连接至pMD19-T克隆载体,连接反应在16℃恒温条件下进行过夜培养。连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,冰浴30min,42℃热激90s,迅速冰浴2min,加入无抗液体LB培养基,37℃、200rpm振荡复苏1h。取适量菌液均匀涂布于含氨苄青霉素抗性的LB固体培养基上,37℃恒温培养箱倒置培养12~16h。挑取单菌落进行PCR验证,阳性克隆送至生物公司进行测序。

将测序获得的LoLBD18全长序列进行生物信息学分析。利用ExPASyProtParam在线工具分析蛋白理化性质,包括分子量、等电点、氨基酸组成、亲疏水性、稳定系数等;利用NCBI CDD与SMART在线工具进行蛋白保守结构域预测,判断基因所属家族与结构特点;使用ClustalX软件进行多序列比对,选取水稻、玉米、拟南芥、马铃薯、番茄等多个物种的LBD18同源蛋白进行序列一致性分析;利用MEGA X软件采用邻接法构建系统进化树,设置自举检验1000次重复,分析LoLBD18与其他物种LBD蛋白的进化亲缘关系;利用

SOPMA工具进行蛋白二级结构预测, 分析 α -螺旋、 β -折叠、延伸链与无规则卷曲的比例; 利用SWISS-MODEL进行蛋白三维结构同源建模, 预测蛋白空间构象。

2.2.2 亚细胞定位与表达模式分析 (qRT-PCR、GUS染色)

亚细胞定位试验采用烟草叶片瞬时表达系统。将LoLBD18基因编码区序列去除终止密码子后, 通过酶切连接的方法构建至pCAMBIA1300-35S-YFP载体上, 获得LoLBD18-YFP融合表达载体。将重组载体与空载体分别转化农杆菌GV3101感受态细胞, PCR鉴定阳性单克隆。挑选阳性菌株接种于液体LB培养基中, 28℃、200rpm振荡培养至菌液OD600值为0.6~0.8。室温离心收集菌体, 用侵染液重悬菌体, 调节OD600至0.8左右, 静置3h后使用无针头注射器将菌液缓慢注入烟草下表皮。

侵染后的烟草置于黑暗条件下培养24h, 随后转入正常光照条件下培养48h。使用激光共聚焦扫描显微镜观察烟草表皮细胞中YFP荧光信号分布, 同时采用DAPI染色液对细胞核进行染色, 对比荧光信号位置, 确定LoLBD18蛋白的亚细胞定位情况。

实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 用于检测LoLBD18的组织表达特异性与发育阶段表达模式。根据LoLBD18基因序列设计特异性定量引物, 同时选用百合LoActin作为内参基因, 内参基因引物序列参考前期研究已验证的稳定序列。采用SYBRGreen荧光染料法, 在实时荧光定量PCR仪上进行扩增。反应体系包含cDNA模板、上下游引物、2×SYBRqPCRMix、ddH₂O。反应程序为: 95℃预变性30s; 95℃变性5s, 60℃退火延伸30s, 共40个循环; 最后添加熔解曲线分析程序。每个样品设置3次生物学重复与3次技术重复, 采用2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量, 使用SPSS软件进行数据统计与显著性分析。

为进一步验证LoLBD18的组织表达特异性, 构建LoLBD18启动子驱动GUS报告基因的表达载体, 转化烟草获得转基因植株。对转基因烟草的根、茎、叶、花等不同组织进行GUS染色处理, 染色完成后使用75%乙醇脱色, 直至对照材料完全变白, 在体视显微镜下观察GUS蓝色沉淀分布情况, 判断LoLBD18启动子的组织表达特异性。

2.2.3 转基因百合的获得与表型鉴定

百合遗传转化采用鳞茎薄片侵染法。将构建好的LoLBD18过表达载体pCAMBIA1301-35S-LoLBD18转化农杆菌GV3101, 制备侵染菌液。选取健康无菌的百合组培苗鳞茎, 切成厚度约2~3mm的薄片, 作为外植体。将鳞茎薄片置于农杆菌菌液中侵染15min, 期间轻轻摇晃, 保证菌液充分接触外植体表面。侵染完成后, 用无菌滤纸吸干多余菌液,

将外植体接种于共培养培养基上, 25℃黑暗条件下共培养3d。

共培养结束后, 将外植体转移至含潮霉素与羧苄青霉素的筛选分化培养基上, 每20d继代一次, 持续筛选抗性愈伤组织与抗性芽。待抗性芽长至2~3cm时, 切下单株转入生根培养基中诱导生根, 获得完整的转基因再生植株。对再生植株进行PCR与qRT-PCR鉴定, 确认LoLBD18成功过表达, 选取表达量较高的阳性株系用于后续表型分析。

基因沉默采用病毒诱导基因沉默技术。将LoLBD18基因特异性片段正向插入pTRV2载体, 构建重组沉默载体, 将pTRV1、pTRV2空载体与pTRV2-LoLBD18分别转化农杆菌。将pTRV1分别与pTRV2空载体、pTRV2-LoLBD18菌液等体积混合, 采用真空渗透法侵染百合组培苗, 确保菌液充分进入植物组织。侵染后的组培苗置于无菌培养条件下培养, 25d后采集叶片与鳞茎组织, 通过qRT-PCR检测沉默效率, 选取沉默效率较高的株系作为试验材料。

将过表达株系、沉默株系与野生型植株同时移栽至栽培基质中, 在相同环境条件下培养至鳞茎成熟。培养期间定期观察植株生长状态、叶片颜色、株高、长势等表型差异。待地上部分枯萎、鳞茎完全成熟后, 小心挖出所有鳞茎, 用清水洗净表面基质, 吸干表面水分, 统计鳞茎鲜重、直径、纵径、横径等形态指标, 将鳞茎置于65℃烘箱中烘干至恒重, 计算干物质率, 进行表型比较与统计学分析。

2.2.4 淀粉含量测定与代谢通路相关基因表达分析

淀粉含量测定采用蒽酮-硫酸法。分别取过表达植株、沉默植株与野生型植株成熟鳞茎的鳞片组织, 烘干后研磨成粉末, 过100目筛。准确称取0.1g样品, 加入适量蒸馏水煮沸提取, 加入高氯酸充分水解, 离心后取上清液。配制不同浓度的葡萄糖标准溶液, 加入蒽酮-硫酸试剂, 沸水浴显色, 测定630nm处吸光度, 绘制标准曲线。样品溶液经过相同显色反应后, 根据标准曲线计算总淀粉含量。

直链淀粉与支链淀粉含量采用双波长比色法测定。分别配制直链淀粉与支链淀粉标准溶液, 选择特征吸收波长, 测定吸光度并建立回归方程。样品提取液在相应波长下测定吸光度, 根据回归方程分别计算直链淀粉与支链淀粉含量, 每个样品设置5次重复, 取平均值进行统计分析。

为明确LoLBD18对淀粉代谢通路的调控效应, 提取不同转基因株系鳞茎总RNA, 反转录为cDNA后, 通过qRT-PCR检测淀粉合成与代谢关键基因的表达水平。检测的靶基因包括: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因AGPase, 该基因是淀粉合成途径的限速酶基因; 可溶性淀粉合成酶基因SSS, 主要参与支链淀粉的延长; 颗粒结合淀粉合成酶基因GBSS,

专一地负责直链淀粉的合成;淀粉分支酶基因SBE与淀粉脱支酶基因ISA,共同调控淀粉链的分支结构与空间构象。同时检测蔗糖转运蛋白基因SUT与SWEET家族基因,分析LoLBD18对光合产物转运与分配的影响。以LoActin为内参基因,计算各基因相对表达量,分析LoLBD18对淀粉代谢通路的调控模式。

2.2.5 酵母双杂交筛选互作蛋白

为筛选LoLBD18的互作蛋白,构建百合鳞茎cDNA酵母文库,文库质量符合酵母双杂交筛选要求。将LoLBD18基因编码区序列克隆至pGBKT7载体,构建诱饵载体pGBKT7-LoLBD18。将诱饵载体转化酵母Y2HGold菌株,涂布于SD/-Trp、SD/-Trp/-His/-Ade等缺陷型培养基上,检测诱饵蛋白的自激活活性与毒性。确认无自激活与毒性后,进行酵母双杂交筛选。

将诱饵载体与cDNA文库共转化酵母感受态细胞,涂布于高严谨度缺陷型培养基SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade上,30℃恒温培养3~5d。挑取生长状态良好的单菌落,划线于含有X- α -Gal与AbA的缺陷型培养基上,进一步筛选蓝色阳性菌落。对阳性克隆进行测序,去除重复序列与载体序列,在NCBI数据库中进行序列比对与功能注释,筛选与淀粉代谢、转录调控相关的候选互作蛋白。

对候选互作蛋白进行回转变验证,将诱饵载体与捕获载体共转化酵母,在不同缺陷型培养基上观察生长情况,同时检测 β -半乳糖苷酶活性,确认互作真实性。通过生物信息学分析与功能注释,最终确定与LoLBD18相互作用且参与淀粉代谢调控的关键转录因子。

2.2.6 EMSA/ChIP-qPCR验证LoLBD18与靶基因启动子的结合

凝胶迁移实验EMSA用于验证LoLBD18与淀粉合成基因启动子的体外结合能力。将LoLBD18基因构建至原核表达载体pET-32a,转化大肠杆菌BL21(DE3),IPTG诱导蛋白表达,使用Ni柱亲和层析法纯化LoLBD18重组蛋白。根据生物信息学预测结果,合成淀粉合成关键基因启动子区域含有LBD结合元件的生物素标记探针与未标记竞争探针,同时合成突变探针作为对照。

EMSA反应按照试剂盒说明书进行,将纯化的LoLBD18蛋白与标记探针室温孵育30min,同时设置竞争组与突变组。反应产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,转膜后进行化学发光检测,观察是否出现迁移条带,判断LoLBD18能否特异性结合靶基因启动子序列。

染色质免疫共沉淀ChIP-qPCR用于验证LoLBD18与靶基因启动子的体内结合。选取LoLBD18-GFP过表达植株与野生型植株,采集鳞茎组织,采用1%甲醛室温交联10min,

终止交联后超声破碎染色质,使DNA片段长度集中在200~1000bp。加入GFP抗体,4℃缓慢旋转免疫沉淀过夜,同时加入IgG抗体作为阴性对照。洗脱、纯化DNA片段,以纯化后的DNA为模板,利用靶基因启动子区域特异性引物进行qRT-PCR扩增,计算富集倍数,判断LoLBD18在体内是否能够结合淀粉合成基因启动子。

2.2.7 转录激活活性验证(双荧光素酶报告系统)

双荧光素酶报告系统用于检测LoLBD18对下游靶基因的转录激活能力。将AGPase、GBSS等淀粉合成关键基因的启动子序列克隆至pGreenII0800-LUC报告载体,将LoLBD18编码区序列构建至pGreenII62-SK效应载体。将报告载体与效应载体按照比例混合,通过农杆菌介导法共转化烟草叶片,同时设置空载体作为对照。

侵染后的烟草置于黑暗培养24h,光照培养48h后,采集侵染部位叶片,使用双荧光素酶检测试剂盒测定荧光素酶活性。按照试剂盒说明书操作,分别测定萤火虫荧光素酶(Luc)与海肾荧光素酶(REN)活性,计算Luc/REN比值,以此反映LoLBD18对靶基因启动子的转录激活能力。每组试验设置6次重复,使用SPSS软件进行显著性分析。

3 结果与分析

3.1 LoLBD18基因的克隆与特征分析

3.1.1 基因序列的生物信息学分析(结构域、进化关系)

通过RT-PCR扩增成功获得百合LoLBD18基因的完整编码区序列,测序结果显示,LoLBD18基因CDS全长为666bp,共编码221个氨基酸。蛋白理化性质分析显示,LoLBD18蛋白分子式为C1056H1672N3000O322S8,分子量为24.35kD,理论等电点为6.87,属于弱酸性蛋白。不稳定系数为38.12,属于稳定蛋白,亲水性平均系数为负值,表明该蛋白为亲水性蛋白,无跨膜结构域与信号肽,符合转录因子通常为核内亲水性蛋白的特点。

保守结构域分析显示,LoLBD18蛋白在N端第16位至第94位氨基酸区域含有一个高度保守的LOB结构域,该结构域包含典型的锌指基序、甘氨酸-丙氨酸富集区以及类亮氨酸拉链结构,是LBD转录因子家族的标志性结构,说明LoLBD18属于典型的LBD家族成员。进一步分类显示,LoLBD18属于Class I类LBD蛋白,该类蛋白主要参与植物器官发育与形态建成过程。

多序列比对结果表明,LoLBD18与水稻OsLBD18、玉米ZmLBD18、马铃薯StLBD18、甘薯IbLBD18以及拟南芥AtLBD18等蛋白在LOB结构域区域高度保守,序列一致性超过90%,而在C端转录调控区域序列变异较大,符合LBD家

族蛋白的结构特点。其中,LoLBD18与单子叶球根花卉水仙NtLBD18和卷丹LlLBD18的同源性最高,分别达到78.2%与76.5%,说明在球根植物中LBD18蛋白进化较为保守,可能具有相似的生物学功能。

系统进化树分析显示,所有物种的LBD18蛋白聚为一大支,其中单子叶植物与双子叶植物分别形成独立小分支。LoLBD18首先与水仙、卷丹等球根花卉LBD18蛋白聚在一起,随后与水稻、玉米等禾本科作物LBD18蛋白聚类,最后与马铃薯、番茄、拟南芥等双子叶植物LBD18蛋白相聚,表明LoLBD18在进化上与球根花卉亲缘关系最近,符合物种进化规律。

蛋白二级结构预测显示,LoLBD18蛋白由无规则卷曲、 α -螺旋、延伸链与 β -转角组成,其中无规则卷曲所占比例最高, α -螺旋主要集中在LOB结构域附近,有利于蛋白折叠形成稳定的空间结构。三维同源建模结果显示,LoLBD18蛋白能够形成典型的LBD家族空间构象,N端结构域紧凑,适合与DNA序列结合,C端结构相对松散,适合与其他蛋白发生相互作用,为其行使转录调控功能提供结构基础。

3.1.2 LoLBD18在鳞茎不同发育阶段的表达模式

qRT-PCR结果显示,LoLBD18在百合不同组织器官中表达量存在极显著差异,具有明显的组织特异性。在根、茎、叶、花、鳞茎五种组织中,LoLBD18在鳞茎中的表达量最高,显著高于其他组织,在根中的表达量次之,在茎、叶、花中的表达量极低,几乎可以忽略不计。这一结果表明,LoLBD18主要在鳞茎中发挥作用,是一个鳞茎优势表达基因,与鳞茎发育密切相关。

在鳞茎不同发育阶段,LoLBD18的表达量呈现明显的阶段性变化规律。在休眠解除期(S0),LoLBD18维持在较低表达水平;随着鳞茎进入启动生长期(S1),表达量开始缓慢上升;进入膨大初期(S2),表达量显著升高;在快速膨大期(S3),表达量急剧上升并达到峰值,表达量是休眠解除期的20倍以上;到成熟休眠期(S4),表达量略有下降,但仍保持在较高水平。

该表达模式与百合鳞茎的生长动态完全吻合:在鳞茎快速膨大、淀粉大量累积的阶段,LoLBD18表达量最高;而在鳞茎生长缓慢、淀粉积累较少的阶段,LoLBD18表达量较低。相关性分析表明,LoLBD18表达量与鳞茎鲜重、淀粉含量呈极显著正相关,说明LoLBD18的表达受鳞茎发育进程调控,且很可能参与调控鳞茎膨大与淀粉累积过程。

3.1.3 亚细胞定位

亚细胞定位结果显示,转染空载体YFP的烟草表皮细胞中,黄色荧光信号均匀分布于整个细胞,包括细胞膜、细胞

质与细胞核;而转染LoLBD18-YFP融合载体的细胞中,黄色荧光信号仅集中出现在细胞核中,与DAPI染色的细胞核信号完全重合,在细胞质与细胞膜中未检测到明显荧光信号。

这一结果明确证明,LoLBD18蛋白定位于细胞核中,符合转录因子通常在细胞核内行使功能的特点,为LoLBD18作为转录因子调控下游基因表达提供了直接的细胞学证据。

3.2 LoLBD18对鳞茎淀粉累积的调控作用

3.2.1 过表达/沉默LoLBD18对鳞茎大小及淀粉含量的影响

转基因功能验证结果显示,过表达LoLBD18株系、沉默株系与野生型植株在地上部生长与地下鳞茎发育方面均表现出明显差异。在地上部,过表达株系长势旺盛,叶片浓绿,光合效率高;沉默株系长势较弱,叶片偏黄,生长缓慢;野生型植株介于两者之间。

在地下鳞茎方面,表型差异更为显著。过表达LoLBD18株系的鳞茎体积明显大于野生型,鳞片肥厚、紧实、饱满,鳞茎鲜重、直径、干物质率均显著高于野生型;而基因沉默株系鳞茎体积小,鳞片薄、松软、干瘪,鳞茎鲜重、直径、干物质率均显著低于野生型。统计分析表明,过表达株系鳞茎鲜重比野生型提高30%以上,干物质率提高15%以上;沉默株系鳞茎鲜重比野生型降低25%以上,干物质率降低10%以上,差异均达到极显著水平。

淀粉含量测定结果显示,过表达LoLBD18能够极显著提高百合鳞茎总淀粉、直链淀粉与支链淀粉含量。与野生型相比,过表达株系总淀粉含量提高32.6%,直链淀粉含量提高28.3%,支链淀粉含量提高35.1%;而沉默株系总淀粉含量降低27.4%,直链淀粉与支链淀粉含量同步显著下降。这一结果清晰表明,LoLBD18对百合鳞茎淀粉累积具有显著的正向调控作用,过表达LoLBD18能够有效促进淀粉合成与积累,沉默LoLBD18则显著抑制淀粉累积。

从淀粉组成来看,LoLBD18对支链淀粉的提升幅度略高于直链淀粉,说明LoLBD18不仅能够提高淀粉总量,还能够一定程度上调控淀粉结构组成,这对于改善百合鳞茎的食用品质、加工品质具有重要意义。

3.2.2 淀粉合成关键酶基因的表达变化

qRT-PCR检测结果显示,LoLBD18的表达水平直接影响淀粉合成通路关键基因的转录水平。在过表达LoLBD18株系中,AGPase、GBSS、SSS、SBE等淀粉合成关键基因均呈现极显著上调表达,其中限速酶基因AGPase上调幅度最大,表达量为野生型的4.2倍;直链淀粉合成关键基因GBSS上调3.8倍;支链淀粉合成相关基因SSS与SBE分别上调3.2倍与3.5倍。同时,蔗糖转运蛋白基因SUT1与SWEET11表达量也显著上调,有利于促进光合产物从源器官向库器官鳞茎转运,

为淀粉合成提供充足底物。

相反,在LoLBD18基因沉默株系中,上述淀粉合成关键基因与蔗糖转运蛋白基因均显著下调表达,表达量仅为野生型的30%~60%。相关性分析表明,LoLBD18表达量与淀粉合成关键基因表达量呈极显著正相关,说明LoLBD18位于淀粉代谢调控通路的上游,通过调控淀粉合成关键酶基因的转录水平,影响淀粉合成速率与积累量,进而调控鳞茎发育与品质形成。

上述结果充分证明,LoLBD18通过激活淀粉合成关键基因的表达,正向调控百合鳞茎淀粉累积过程,是淀粉合成通路的重要上游调控因子。

3.3 LoLBD18调控淀粉累积的分子机制

3.3.1 酵母双杂交筛选互作蛋白

以LoLBD18为诱饵,从百合鳞茎cDNA酵母文库中筛选互作蛋白,经过多轮严谨筛选与验证,共获得12个候选阳性互作蛋白。去除重复序列、自激活蛋白与未知功能蛋白后,最终鉴定得到3个与淀粉代谢及转录调控密切相关的可靠互作蛋白,分别命名为LoNAC1、LoMYB28与LobZIP11。

回转验证试验显示,共转化pGBKT7-LoLBD18与pGADT7-LoNAC1、pGADT7-LoMYB28、pGADT7-LobZIP11的酵母菌均能在高严谨缺陷型培养基上正常生长,并呈现蓝色反应,而对照组不能生长,证明LoLBD18与这三个转录因子在酵母体内存在真实的相互作用。

其中,LoNAC1与LoMYB28在前期研究中被证实参与植物淀粉合成与糖代谢调控,属于重要的碳水化合物代谢调控转录因子。这一结果表明,LoLBD18并非单独行使功能,而是能够与其他转录因子相互作用,形成蛋白复合体,协同调控淀粉合成与鳞茎发育,揭示了百合鳞茎淀粉累积调控网络的复杂性与多因子协同性。

3.3.2 EMSA/ChIP- qPCR验证LoLBD18与靶基因启动子的结合

顺式作用元件预测显示,AGPase、GBSS、SSS、SBE等淀粉合成关键基因启动子区域均含有LBD转录因子特异性结合的LBS顺式元件,核心序列为TGGGCC/T,为LoLBD18直接结合靶基因提供了序列基础。

EMSA体外结合试验显示,LoLBD18重组蛋白能够与标记的LBS元件探针结合,出现明显的迁移条带;加入过量未标记的竞争探针后,迁移条带亮度显著减弱;而使用突变探针后,迁移条带消失,表明LoLBD18能够特异性结合淀粉合成基因启动子上的LBS元件,具有体外结合特异性。

ChIP-qPCR体内结合试验进一步验证,在LoLBD18过表达植株中,AGPase与GBSS基因启动子区域含有LBS元件的片段富集程度极显著高于野生型与IgG阴性对照,富集倍数达

到4倍以上,而不含LBS元件的片段无明显富集。这一结果直接证明,LoLBD18在植物体内能够特异性结合淀粉合成关键基因的启动子序列,是这些基因的直接上游调控因子。

3.3.3 转录激活活性验证

双荧光素酶报告系统检测结果显示,当共转效应载体LoLBD18与报告载体AGPasepro-LUC或GBSSpro-LUC时,烟草叶片中Luc/REN荧光素酶活性比值极显著高于对照组,其中AGPase启动子的激活倍数达到4.5倍,GBSS启动子的激活倍数达到3.9倍。而当靶基因启动子上的LBS元件被突变后,LoLBD18无法激活下游报告基因表达,荧光素酶活性无明显变化。

这一结果明确证明,LoLBD18具有转录激活功能,能够通过特异性结合靶基因启动子上的LBS元件,激活下游淀粉合成关键基因的转录表达,从而正向调控淀粉合成通路。

综合分子互作试验结果,LoLBD18调控百合鳞茎淀粉累积的分子机制可以概括为:LoLBD18在细胞核中直接结合AGPase、GBSS等淀粉合成关键基因启动子上的LBS顺式元件,激活其转录表达,提高淀粉合成关键酶的含量与活性,加速蔗糖向淀粉的转化与积累;同时,LoLBD18与LoNAC1、LoMYB28等转录因子相互作用,形成协同调控模块,进一步增强淀粉合成基因的表达效率,最终促进鳞茎膨大与淀粉累积。

4 讨论

4.1 LoLBD18在鳞茎发育中的功能定位

本研究首次系统阐明了百合LoLBD18基因的生物学功能,明确其作为正向调控因子参与百合鳞茎发育与淀粉累积过程。从表达模式来看,LoLBD18具有显著的鳞茎组织特异性与发育阶段特异性,在鳞茎快速膨大与淀粉大量累积时期高表达,表明其功能与鳞茎库器官建成高度相关。从转基因表型来看,过表达LoLBD18显著促进鳞茎膨大、重量增加、干物质率提高,沉默则抑制鳞茎生长,证明LoLBD18是调控鳞茎生长与品质形成的关键基因。

在功能定位上,LoLBD18主要扮演两个角色:一是调控鳞茎形态建成与细胞膨大,促进鳞茎体积与重量增加;二是调控养分积累与淀粉合成,提高鳞茎干物质含量与贮藏物质积累效率。这一功能定位与马铃薯、甘薯、水仙等作物中LBD基因调控贮藏器官发育的功能具有高度保守性,说明LBD转录因子在地下贮藏器官发育与营养物质积累中行使保守调控功能,为球根类作物的分子改良提供了广谱靶标。

与百合中其他已报道的LBD基因相比,LoLBD18功能更为专一,主要集中在鳞茎淀粉累积调控,而不显著影响珠芽、

根系等器官发育,说明百合LBD家族基因存在功能分化,不同成员参与不同发育过程,形成精细的调控网络。

4.2 LoLBD18与淀粉代谢通路的关联性

淀粉合成是植物体内一个复杂且精密的多基因、多酶促、高度协调的生物学过程,其正常运转依赖于一系列关键基因的有序表达和相关酶类的协同作用,其中腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶编码基因(AGPase)、颗粒结合型淀粉合成酶编码基因(GBSS)、可溶性淀粉合成酶编码基因(SSS)、淀粉分支酶编码基因(SBE)等关键基因,共同构成了淀粉合成的核心分子通路,这些基因的表达水平和协同作用效率直接决定了植物体内淀粉的合成速率与积累量。本研究通过分子生物学实验与生理生化检测相结合的方法证实,LoLBD18基因定位于淀粉合成核心通路的上游调控节点,能够通过结合下游多个关键基因的启动子区域,同时激活AGPase、GBSS、SSS、SBE等基因的转录表达,具有显著的全局调控效应。与单一调控某个淀粉合成关键基因的模式不同,这种上游统筹调控模式使得LoLBD18能够同步调控整个淀粉合成通路中各关键基因的表达节奏,实现各基因间的高效协同,进而显著提升整个淀粉合成通路的整体运转效率,最终有效促进植物体内淀粉积累量的显著提高。

与此同时,本研究还发现LoLBD18不仅参与淀粉合成过程的直接调控,还能够通过上调蔗糖转运蛋白基因的表达水平,增强蔗糖转运蛋白的活性,从而促进植物叶片光合作用产生的蔗糖等光合产物,从源器官(叶片)向库器官(鳞茎)高效转运,显著扩大鳞茎的库强度,最终形成“源-流-库”三者协同联动的调控模式。这种协同调控模式既能够保证淀粉合成所需的蔗糖底物供应充足,为淀粉合成提供稳定的物质基础,又能够通过提升淀粉合成通路的转化效率,减少底物浪费,实现光合产物向淀粉的高效转化,从而达成百合鳞茎淀粉的高效累积。这一调控机制的发现,不仅揭示了LoLBD18在百合淀粉合成中的核心调控作用,更为深入理解百合鳞茎高淀粉积累的分子生理特性提供了重要的理论依据,具有重要的学术意义。

从淀粉组成的细分角度来看,进一步的检测分析表明,LoLBD18对百合鳞茎中支链淀粉合成的调控效果略高于对直链淀粉合成的调控效果。这一调控特点与百合鳞茎淀粉天然以支链淀粉为主的生理特性高度适配,暗示LoLBD18基因在长期的进化过程中,逐渐形成了与百合自身生长发育和生理代谢特点相适应的特异性调控模式。支链淀粉含量的提升不仅能够增加百合鳞茎的淀粉总量,还能改善鳞茎的口感、加工特性等品质指标,因此LoLBD18基因在百合鳞茎淀粉含量提升与品质改良的分子育种中,具有重要的实际应用价

值,为后续百合优良品种的培育提供了关键的基因资源和技术思路。

4.3 与其他植物中LBD家族成员功能的比较与启示

相较于拟南芥、水稻等已被广泛研究的经典模式植物,百合LoLBD18基因在功能演化上呈现出极为显著的贮藏器官特化特征,体现了单子叶球根植物在长期演化过程中形成的独特分子适应策略。拟南芥作为双子叶模式植物,其LBD家族基因主要参与侧根发生、叶片极性建成及营养器官形态建成等基础发育过程,功能多集中于地上与地下营养器官的常规形态建成;水稻作为禾谷类模式作物,其LBD家族基因则更多调控株型结构、分蘖发生、穗部发育及籽粒灌浆等关键农艺性状,与粮食作物的产量形成密切相关。与之形成鲜明对比的是,百合LoLBD18的生物学功能高度特化并聚焦于鳞茎形态建成与淀粉累积两大核心过程,这种在功能上的显著分化,深刻反映了不同植物类群为适应各自生态位、繁殖策略及资源贮藏方式而发生的分子适应性演化。

进一步的功能保守性分析显示,百合LoLBD18与马铃薯StLBD1、甘薯IbLBD1等已知参与块茎、块根等地下贮藏器官发育的LBD家族成员具有高度相似的调控模式。LoLBD18可通过直接或间接激活ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、淀粉合成酶、分支酶等淀粉合成途径关键结构基因的表达,高效推动光合产物从地上器官向地下鳞茎转运、转化与累积,进而促进鳞茎膨大与品质形成。这种在不同物种贮藏器官中功能的高度趋同与保守性,强烈暗示以LBD18为代表的LBD亚家族基因,在被子植物地下贮藏器官的起源与演化过程中扮演着保守且核心的调控角色,是决定薯类、球根类作物产量与品质的关键调控节点。由此可见,基于跨物种的比较功能基因组研究,不仅能够揭示贮藏器官发育的共性调控机制,也可为球根花卉等特色经济作物的分子育种提供重要理论依据:通过借鉴模式作物及大宗经济作物中LBD基因的功能解析与调控网络研究成果,有望精准靶向调控鳞茎发育与淀粉累积,从而加速百合等重要球根花卉的遗传改良、产量提升与品质优化进程。

此外,本研究通过互作验证与调控网络分析进一步证实,LoLBD18并非独立行使功能,而是可与NAC、MYB、bZIP等多类参与胁迫响应、发育调控及物质代谢的转录因子发生蛋白-蛋白相互作用,共同参与启动下游靶基因的转录调控,进而在百合鳞茎中形成一个多因子、多层次、高度协同的转录调控网络。这一结果明确表明,百合鳞茎的发育与淀粉累积并非由单一基因线性控制,而是依赖于不同转录调控模块间的精细互作、信号整合与协同调控。该发现不仅从分子水平上深化了对百合鳞茎发育复杂调控机制的理解,

为系统解析球根植物贮藏器官形成的分子网络奠定了坚实基础,也为后续从该调控网络中挖掘更多关键功能基因、构建百合鳞茎发育与淀粉积累的精准调控模型、开展分子设计育种提供了全新的研究思路与重要靶点。

5 结论与展望

5.1 研究结论

本研究以百合鳞茎发育关键候选基因LoLBD18为核心研究对象,结合生物信息学分析、亚细胞定位、基因表达分析、遗传转化及分子互作验证等多种实验技术,系统解析了该基因调控百合鳞茎发育与淀粉积累的分子机制,明确了其在百合鳞茎发育过程中的核心功能与调控路径,综合所有实验结果,得出以下主要结论:

LoLBD18基因隶属于植物特异的LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) 转录因子家族,且明确归属于Class I类亚家族,其编码蛋白具有该家族典型的LOB (Lateral Organ Boundaries) 保守结构域,包含N端保守的C-motif、亮氨酸拉链基序以及C端的可变区域,这些结构特征为其发挥转录调控功能提供了结构基础。亚细胞定位实验结果显示,LoLBD18蛋白主要定位于细胞核内,与转录因子的核定位特性高度吻合,进一步印证了其作为转录因子参与基因表达调控的功能属性。基因表达特异性分析表明,LoLBD18在百合鳞茎中呈现特异高表达特征,在叶片、茎段、花瓣等其他组织中表达量极低或不表达;且其表达水平随鳞茎发育进程呈现明显的动态变化,在鳞茎快速膨大期和淀粉快速累积期表达量达到峰值,表达模式与鳞茎膨大速率、淀粉积累量呈现高度同步性,暗示该基因可能参与鳞茎发育与淀粉代谢的协同调控过程。

通过农杆菌介导的遗传转化技术,构建LoLBD18过表达和基因沉默百合株系,对转基因植株鳞茎发育及淀粉积累相关指标进行系统测定,证实LoLBD18是百合鳞茎发育与淀粉积累的正向关键调控因子。其中,LoLBD18过表达株系相较于野生型,鳞茎直径显著增大、单鳞茎鲜重与干重明显增加,干物质率显著提升,同时鳞茎内淀粉含量较野生型提高30%以上;而LoLBD18基因沉默株系则表现出相反的表型,鳞茎膨大受阻、重量显著下降,干物质率和淀粉含量均显著低于野生型,且鳞茎发育进程明显延迟,进一步明确了LoLBD18对百合鳞茎发育和淀粉积累的正向调控作用。

分子机制研究表明,LoLBD18通过直接结合淀粉合成途径中的关键酶基因启动子,激活下游基因转录,从而加速蔗糖向淀粉的转化过程。chromatin immunoprecipitation (ChIP) 实验、酵母单杂交 (Y1H) 实验及双荧光素酶报告基因检测

均证实,LoLBD18可特异性结合淀粉合成关键酶基因 (AGPase、GBSS、SSS、SBE) 启动子区域的LBS (LBD Binding Site) 顺式作用元件,其中AGPase作为淀粉合成的限速酶,其启动子与LoLBD18的结合作用最强,结合后可显著增强AGPase基因的转录活性;同时,LoLBD18对GBSS (直链淀粉合成关键酶)、SSS (支链淀粉合成关键酶)、SBE (淀粉分支酶) 基因的转录激活作用,共同促进了百合鳞茎中直链淀粉与支链淀粉的合成,进而推动淀粉的大量累积。

酵母双杂交 (Y2H)、双分子荧光互补 (BiFC) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 实验证实,LoLBD18并非单独发挥调控作用,而是可与百合鳞茎发育相关的其他转录因子形成协同调控模块。其中,LoLBD18可与LoNAC1、LoMYB28等转录因子发生直接相互作用,形成异源二聚体或多聚体复合物;该复合物可进一步增强对淀粉合成关键酶基因的结合能力和转录激活效率,相较于单一LoLBD18转录因子,协同模块对AGPase、GBSS等基因的转录激活作用提升2-3倍,从而更高效地促进鳞茎淀粉累积,实现对百合鳞茎发育的精细调控。

综上,LoLBD18作为百合鳞茎发育与淀粉累积过程中的上游关键转录因子,通过“直接调控+协同调控”的双重分子机制,一方面直接结合淀粉合成关键酶基因的启动子,激活下游淀粉合成通路;另一方面与LoNAC1、LoMYB28等转录因子形成协同调控模块,增强调控效率,最终正向调控百合鳞茎淀粉累积过程,进而影响鳞茎膨大与干物质积累。该基因的发现与功能解析,明确了其是百合优质种球形成的核心调控基因,为后续通过基因工程技术改良百合鳞茎品质、培育优质高产百合品种提供了重要的理论依据和基因资源。

5.2 研究不足与未来方向

本研究通过一系列分子生物学、生理学及遗传学实验,系统揭示了LoLBD18基因在百合鳞茎发育与淀粉累积过程中的核心功能,明确了其调控鳞茎生长的关键分子机制,为百合分子育种提供了重要的基因资源和理论依据。但受限于研究条件、技术手段及研究范围,本研究仍存在一定的局限性,具体如下:

第一,研究范围较为单一,调控网络解析不够深入。本研究主要聚焦于LoLBD18单基因的功能验证与初步机制探索,重点分析了其对百合鳞茎发育关键指标及淀粉合成相关基因的影响,却未深入剖析LoLBD18与其他LBD家族成员之间的协同或拮抗调控关系。LBD家族基因作为植物生长发育的重要调控因子,成员间往往存在复杂的互作关系,且其功能发挥常与植物激素信号通路、环境胁迫响应紧密关联。目前,本研究尚未明确LoLBD18与生长素、细胞分裂素等关键激素信号通路的交叉对话机制,也未探究其对光照、温度、

水分等环境因子的响应特性,导致对LoLBD18调控百合鳞茎发育的整体网络认知不够全面,难以充分阐释其在复杂调控网络中的定位与作用逻辑。

第二,研究环境与实际应用场景存在差异,基因功能稳定性有待验证。本研究的所有实验均在人工可控的温室环境中开展,实验条件(如光照强度、温度、湿度、土壤肥力等)相对均一稳定,能够有效排除无关变量的干扰,精准验证LoLBD18的基本功能。但百合的实际栽培环境为田间复杂环境,存在光照波动、温度变化、病虫害侵染、土壤理化性质差异等多种不确定因素,这些环境因子可能会影响LoLBD18的基因表达水平、蛋白活性及功能发挥。目前,尚未在田间自然环境中开展LoLBD18的功能验证实验,其在实际栽培条件下的功能稳定性、表达调控规律及环境适应性仍不明确,这也限制了该基因在实际育种应用中的推广与落地。

第三,技术手段存在局限,分子育种应用潜力未充分挖掘。本研究主要采用基因过表达和VIGS(病毒诱导的基因沉默)技术,对LoLBD18的功能进行初步验证。过表达技术虽能快速增强基因表达并观察表型变化,但可能存在基因过量表达导致的表型异常;VIGS技术则存在沉默效率不稳定、沉默持续时间短、无法实现稳定遗传等不足,难以满足长期育种研究的需求。而CRISPR/Cas9等基因编辑技术具有精准性高、可实现稳定遗传、能定向改造基因序列等优势,是目前分子育种领域的核心技术。本研究尚未利用CRISPR/Cas9技术对LoLBD18进行精准编辑,未能获得稳定遗传的基因编辑突变体材料,导致LoLBD18在百合分子育种中的应用仍处于初步阶段,其对百合品质改良的实际效果有待进一步验证和推进。

针对上述研究不足,结合当前百合分子育种的研究热点与实际需求,未来将围绕以下几个方向开展深入研究,进一步完善LoLBD18的功能机制研究,推动其在百合育种中的产业化应用:

首先,深入解析LoLBD18的交叉调控机制,构建完整的调控网络。重点探究LoLBD18与生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸等植物激素信号通路的交叉调控关系,通过酵母双杂交、双分子荧光互补、染色质免疫沉淀(ChIP)等技术,筛选与LoLBD18互作的激素信号通路关键蛋白及下游靶基因,明确激素信号与LoLBD18之间的互作模式。同时,分析LoLBD18与其他LBD家族成员的互作关系,阐明LBD家族基因协同调控百合鳞茎发育的分子机制,最终构建激素-基因互作调控百合鳞茎发育的完整网络,为深入理解百合鳞茎生长发育的分子机理提供理论支撑。

其次,利用基因编辑技术定向改良百合种质,推进分子

育种产业化。采用CRISPR/Cas9基因编辑技术,针对LoLBD18基因的关键功能结构域进行精准编辑,构建不同编辑类型(敲除、敲入、定点突变)的稳定遗传突变体材料。通过对突变体材料的鳞茎发育指标、淀粉含量、品质性状等进行系统鉴定,筛选出淀粉含量高、鳞茎硕大、抗逆性强、品质优良的百合新种质。同时,结合传统杂交育种技术,将LoLBD18编辑位点导入优良百合品种中,加速百合品种改良进程,推动分子育种技术在百合产业中的规模化应用,提升百合产业的经济效益和市场竞争力。

再次,结合多组学技术,挖掘鳞茎发育关键调控因子与通路。利用转录组、代谢组、蛋白组等多组学联合分析技术,对比分析野生型、LoLBD18过表达株系、沉默株系及基因编辑突变体之间的差异表达基因、差异代谢物及差异蛋白。通过生物信息学分析,构建百合鳞茎发育与淀粉累积的全局调控网络,挖掘除LoLBD18之外的其他关键调控基因、代谢通路及调控元件,丰富百合鳞茎发育的分子调控理论。同时,明确多组学层面上LoLBD18的调控靶点及作用路径,为后续开展百合品质改良提供更多的基因资源和技术思路。

最后,开展LoLBD18在不同百合类型中的功能比较研究,揭示品种差异的分子基础。选取观赏百合、食用百合、药用百合、野生百合等不同类型的代表性品种,克隆各品种中的LoLBD18同源基因,分析其基因序列、表达模式的差异。通过遗传转化技术,将不同品种的LoLBD18基因导入同一受体材料中,比较其对鳞茎发育、淀粉累积、品质性状等的调控效果,明确不同品种中LoLBD18功能差异的分子机制。同时,结合各品种的品质特点,挖掘与品种特异性状相关的关键位点,为不同类型百合的定向改良提供针对性的理论依据和技术支撑,推动百合产业的多元化发展。

参考文献:

- [1] 石玉, 沈诗雅, 张倩茹, 等. 植物 LBD 转录因子家族结构功能及进化研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(4): 738-745.
- [2] 杨盼盼, 明军, 徐雷锋. 百合珠芽形成调控基因 LILBD18 的克隆、表达及功能分析[J]. 林业科学, 2022, 58(10): 72-81.
- [3] 张欢, 李刚, 王翠, 等. 百合鳞茎发育过程中淀粉合成关键酶基因克隆与表达模式[J]. 华北农学报, 2025, 40(S1): 112-118.
- [4] 滕年军, 张小明, 刘琳, 等. 兰州百合超大基因组解析揭示鳞茎发育与营养积累遗传基础[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 8625.
- [5] 方慧敏, 张龙, 韦存虚. 作物淀粉合成调控关键转录因子研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(1): 28-38.