

东方百合 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

孔祥红, 骆远方, 赵一燃, 朱云涛, 聂玉微, 何恒斌*

(北京林业大学 园林学院, 北京 100083)

摘要: *AS1* 和 *AS2* 基因在植物叶片发育过程中具有重要作用, 然而东方百合 *LoAS1* 和 *LoAS2* 是否在鳞茎低温休眠过程中起调控作用尚未见报道。为研究 *LoAS1* 和 *LoAS2* 与鳞茎低温休眠过程中侧生原基发育的相关性, 通过同源克隆得到‘索邦’百合 MYB 转录因子 *LoAS1* 和 LBD 家族基因 *LoAS2*, 并进行系统进化树构建, 经实时荧光定量 PCR、亚细胞定位等分析其表达特征。结果表明: (1) *LoAS1* 基因编码序列长度为 1 035 bp, 共编码 344 个氨基酸, *LoAS2* 基因编码序列长度为 717 bp, 共编码 238 个氨基酸。(2) 系统进化分析显示, *LoAS1* 与老鸦瓣、卷丹亲缘关系较近, 与拟南芥、玉米、水稻等 *AS1* 同源基因亲缘关系最远; *LoAS2* 与油棕、椰子亲缘关系较近, 与玉米、水稻亲缘关系较远。(3) 保守基序和结构域分析显示, *LoAS1*、*LoAS2* 分别与其他植物中的同源蛋白含有相同的保守基序和 N 端结构域。(4) 亚细胞定位结果显示, *LoAS1* 蛋白定位于细胞核, *LoAS2* 蛋白定位于细胞质和细胞核。(5) *LoAS1* 和 *LoAS2* 在低温贮藏过程中, 整体表达量显著高于常温组, 二者均响应低温在茎尖中上调表达, 并在 30~40 d 表达量上升到最高。(6) 石蜡切片结果显示, 低温贮藏 45 d 时, 百合鳞茎侧生原基明显增大, 与 *LoAS1* 和 *LoAS2* 表达特征相吻合。该研究表明, *LoAS1* 和 *LoAS2* 可能对百合鳞茎休眠解除过程中侧生原基的发育具有重要作用, 为百合鳞茎休眠解除机制研究提供了分子依据。

关键词: 东方百合‘索邦’, *LoAS1*, *LoAS2*, 亚细胞定位, 表达分析

中图分类号: Q943

Cloning, subcellular localization and expression analysis of

LoAS1 and *LoAS2* genes in *Lilium oriental hybrids*

KONG Xianghong, LUO Yuanfang, ZHAO Yiran, ZHU Yuntao, NIE Yuwei, HE Hengbin*

(School of Landscape Architecture, Beijing Forest University, Beijing 100083, China)

Abstract: *AS1* and *AS2* genes have critical roles in plant leaf development, however, whether Oriental lily *LoAS1* and *LoAS2* play a regulatory role in bulb low-temperature dormancy has not been reported. In order to investigate the correlation between *LoAS1* and *LoAS2* and the development of lateral primordia during bulb low-temperature dormancy, we obtained the 'Sorbonne' lily MYB transcription factor *LoAS1* and the LBD family gene *LoAS2* by homologous cloning, constructed a phylogenetic tree, and analyzed their expression characteristics by RT-qPCR and subcellular localization. The results were as follows: (1) The coding sequence length of *LoAS1* was 1 035 bp, encoding a total of 344 amino acids, while the coding sequence length of *LoAS2* was 717 bp, encoding a total of 238 amino acids. (2) Phylogenetic analysis revealed that *LoAS1* was more closely related to homologous proteins in *Amana edulis* and *Lilium lancifolium*, and most distantly related to *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Zea may*; *LoAS2* was more closely related to homologous proteins in *Elaeis guineensis* and *Cocos nucifera*, and more distantly related to *Oryza sativa* and *Zea may*. (3) Conserved motifs and structural domains

基金项目: 国家自然科学基金 (32371951)。

第一作者: 孔祥红 (2000—), 硕士研究生, 研究方向为花卉种质资源与遗传育种, (E-mail) 1768187709@qq.com。

***通信作者:** 何恒斌, 博士, 教授, 主要研究方向包括园林植物种质资源与遗传育种、繁殖与栽培技术、重要性状 (花色、球根花卉休眠等) 的分子形成机制研究等, (E-mail) hengbinhe_1220@bjfu.edu.cn。

analysis revealed that LoAS1 and LoAS2 share conserved motifs and N-terminal domains with their homologous proteins in other plants. (4) The results of subcellular localization revealed that LoAS1 protein was localized in the nucleus and LoAS2 protein in the cytoplasm and nucleus. (5) The overall expression levels of *LoAS1* and *LoAS2* were significantly higher than those in the control group stored at room temperature., and both of them were up-regulated in the shoot apex in response to the cold temperature, with their expression peaking at 30~40 days of storage. (6) The results of paraffin sections revealed that the lateral primordia of lily bulbs were significantly enlarged at 45 days of low-temperature storage, which was consistent with the expression patterns of *LoAS1* and *LoAS2*. The study indicates that *LoAS1* and *LoAS2* may play an important role in the development of lateral primordia during the dormancy release process of lily bulbs, which provides a molecular basis for further research into the dormancy release mechanism of lily bulbs.

Key words: Oriental lily 'Sorbonne', *LoAS1*, *LoAS2*, subcellular localization, expression analysis

东方百合花大色艳，芳香馥郁，在国际切花市场中占有重要地位，其中‘索邦’（*Lilium orential* ‘Sorbonne’）是最为知名的代表性品种之一。目前，多数百合品种都由温带的野生种驯化、培育而来，均有鳞茎低温内休眠的生理现象。低温贮藏是百合生产和研究中最常用和最有效的打破休眠的方法（李翊华，2010）。

不同植物在低温环境中会有不同的响应策略，如逆境胁迫、春化、低温层积、休眠等（Ding et al., 2020）。对于众多温带木本植物，夏末秋初的短日照和温度下降会启动休眠过程，休眠前芽的分化和发育都已完成（Azeez et al., 2021），休眠过程中芽内的分生组织和叶原基生长停滞（Anderson, 2015），休眠解除即可展叶开花。但有些植物的休眠芽的发育却是动态变化的。例如，桃花花芽在冬季需冷量积累过程中才得以分化完全（Canton et al., 2022）；牡丹种子需依次打破根和芽的休眠才可萌发（Jin et al. 2006; Hao et al., 2014）。作为隐芽植物，百合属植物的地上组织在秋季枯萎脱落，地下鳞茎进入内休眠状态；冬季低温促进其休眠解除，进而在春季正常发芽、生长、开花（侯玲玲等，2006）。百合鳞茎休眠后，仍在不断发生相关调控过程（Fan et al., 2021），叶原基不断从茎尖分生组织分化出来（刘芳等，2015; Pan et al., 2023）。休眠解除后鳞茎开始萌发，叶片是最早出现的结构之一。在百合休眠解除相关研究中，休眠芽仍然进行侧生器官（如叶原基等）发育的调控机制还不清楚，值得深入研究。

叶原基是首先由顶端分生组织（SAM）中的“起始细胞”（Founder cell）进入周边区（Peripheral zone, PZ），再进一步分裂、分化形成的组织（Scanlon, 2000; 赵方东等，2017）。叶原基作为侧生器官沿三个轴向生长：基-顶轴，中-侧轴，近-远轴（刘涛等，2024）。许多参与叶片发育的突变体已经被鉴定和详细表征。其中，*AS1*（*ASYMMETRIC LEAVES 1*）和 *AS2*（*ASYMMETRIC LEAVES 2*）是叶原基起始和叶片正常发育的关键调控者，它们在叶原基中特异性表达，并形成转录复合物抑制茎尖分生组织特异转录因子 *KNOX*（*Knotted1-like homeobox*）的表达，从而赋予叶原基“身份”（identity）（Chuck et al., 1996; Timmermans et al., 1999; Byrne et al., 2000; Matsumura et al., 2009）。

AS1 基因编码一种含有 R2-R3 MYB 结构域的蛋白，是金鱼草 *PHAN*（*PHANTASTICA*）（Waites & Hudson, 1995）和玉米 *RS2*（*ROUGH SHEATH2*）（Schneeberger et al., 1998）的同源基因。研究表明，*AS1* 参与了叶片细胞分化的调控，*AS1* 位点的突变可导致营养叶和茎生叶变宽且褶皱，突变株系长势变弱（Serrano-Cartagena et al., 1999）；在其他细胞高度增殖的组织中也发现 *AS1* 有高水平的表达，这进一步表明其在细胞分裂和早期细胞分化中的发挥作用（Sun et al., 2002）。拟南芥 *AS2* 基因是 LBD[Lateral organ boundaries (LOB) domain]家族的一员，LBD 蛋白由保守的 N 端 LOB 结构域和可变的 C 端区域组成（Matsumura et al., 2009; Machida et al., 2022），不仅在植物的侧生器官发育中起关键调控作用（Majer & Hochholdinger, 2011; Ando et al., 2023），还可以在

植物生长和发育过程中发挥多种功能 (Xu et al., 2016)。AS2 可与 AS1 形成复合物, 进而与 H3K9 甲基转移酶 KYP/SUVH5/6 (KRYPTONITE/SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOG5/6) 等表观遗传因子相互作用 (Hung et al., 2023), 还可招募 PRC2 (Polycomb Repressive Complex2) 进行 DNA 甲基化 (Machida et al., 2015; Vial-Pradel et al., 2018), 参与远轴基因 *ETT/ARF3* (*ETTIN/AUXIN RESPONSE FACTOR3*)、*ARF4* 和 1 类 *KNOX* 同源基因的转录抑制, 从而调控叶片发育和形态建成 (Ikezaki et al., 2010; Iwasaki et al., 2013)。AS2-AS1 还可通过募集染色质重塑因子 HIRA 形成染色质抑制状态, 沉默 *KNOX* 基因从而促进叶片分化 (Guo et al., 2008)。

本研究以东方百合‘索邦’为材料, 提取 RNA 并克隆得到 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因, 并进行生物信息学分析、亚细胞定位; 利用 RT-qPCR 对低温和常温贮藏过程中 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因在茎尖中的表达模式进行分析, 并对低温贮藏关键时期的茎尖进行石蜡切片观察, 拟探讨如下问题:

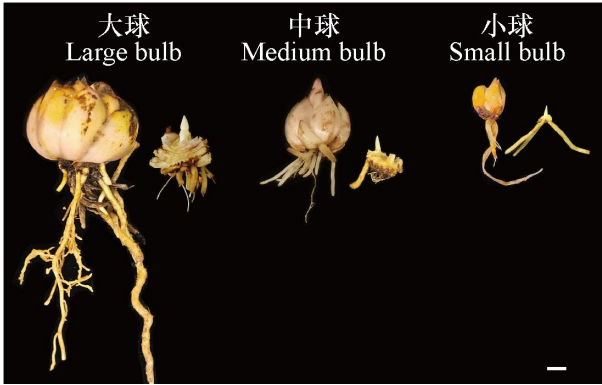
(1) 分析 *LoAS1* 和 *LoAS2* 蛋白的特征, 确定二者在细胞中的表达位置; (2) 低温和常温贮藏条件下, 探究 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因在鳞茎茎尖的表达特征, 分析二者在鳞茎低温贮藏中的潜在功能。本研究不仅为深入解析 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因在低温休眠解除中的功能奠定了基础, 也为揭示低温解除鳞茎休眠过程中侧生原基的发育机制提供了新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

以 2021 年 12 月底在北京市顺义鲜花港温室种植的东方百合‘索邦’为试验材料, 分别取足量上部叶、下部叶, 用于基因克隆, 所取材料经过液氮速冻后立即放入 -80 °C 冰箱。

试验所用种球贮存于北京林业大学北林科技温室和冷库。根据前期组内观察结果将种球按周径和后续发育进程分为大球 (≥10 cm, 正常开花)、中球 (7~10 cm, 有花芽但不能开花), 小球 (3~7 cm, 可抽茎但不产生花芽) (图 1)。为探究具有不同发育进程的种球低温和常温贮藏过程中基因的表达动态, 对大、中、小球都进行了取材。取材前需依次将鳞茎的外层、中层、内层鳞片剥除至茎尖高度约 7~8 mm (图 1), 用干净的刀片水平切下茎尖部分, 用锡箔纸包裹并做好标记, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中。



注: 比例尺为 1 cm

Note: Scale bar = 1 cm

图 1 百合茎尖取材示意图

Fig. 1 Schematic diagram of lily stem apex extraction

根据前人对于百合解除休眠温度的研究 (刘艳萍, 2007), 设置低温 (4 °C) 实验组和常温 (23 °C) 对照组。将贮藏前茎尖取材并命名为 R0 (C0), 然后将对照组和实验组分别放入 23 °C 温室和 4 °C 冷库中。根据课题组前期对于百合鳞茎春化和休眠解除具体时间节点的研究, 在 10、15、20、30、40、45、50、60 d 分别对实验组和对照组进行取材, 根据贮藏时间将低温实验组茎尖命名 C10-C60, 常温对照组茎尖命名为 R10-R60。每个时期取 3 个生物学重复, 共取得大、中、

小球茎尖 153 个。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

将材料置于液氮中充分研磨，使用 EASY Spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒（北京艾德莱）提取样品总 RNA，测定浓度后置于-80 °C冰箱保存。使用 Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix 试剂盒（东洋纺生物科技有限公司）对样品 RNA 进行反转录，将所得 cDNA 置于-20 °C保存。

1.2.2 AS1、AS2 基因编码序列的克隆

在课题组已有的东方百合‘索邦’转录组数据库中对拟南芥 AS1 和 AS2 进行 Blast 分析，筛选获得预期的 *LoAS1*、*LoAS2* 基因序列，设计克隆引物 F1、R1 和 F2、R2（表 1），以东方百合‘索邦’上部叶片和下部叶片的 cDNA 配置混合模板，使用 Prime STAR Max (TaKaRa)，对 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因编码区序列进行扩增。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in the test

引物编号	引物名称	引物序列 (5'-3')
Primer number	Primer name	Primer Sequence (5'-3')
F1	<i>LoAS1</i> -clone-F	ATGAAGGAAAGACAGCGGTGGGGAT
R1	<i>LoAS1</i> -clone-R	TCACCGTCCATTGCGCTCAGACGAT
F2	<i>LoAS2</i> -clone-F	ATGGCATCGTCTTCAGCCTCAATGA
R2	<i>LoAS2</i> -clone-R	TCACGACGGCCCGATGCCCCGACCT
F3	<i>LoActin</i> -qPCR-F	CCCATTGAGCACGGCATTGTC
R3	<i>LoActin</i> -qPCR-R	GGATTGAGAGGAGCTTCGGTGAGA
F4	<i>LoAS1</i> -qPCR-F	AGCGAAGCACGGTAACAAGTG
R4	<i>LoAS1</i> -qPCR-R	GATCGTACTTGCCAGGCTCAA
F5	<i>LoAS2</i> -qPCR-F	CAACGTGACAAAGCTGCTGAA
R5	<i>LoAS2</i> -qPCR-R	GATACAGCCCCAAGATGAGCA
F6	<i>LoAS1</i> -eGFP-F	TTACAACCTCACTCAAGTCCGTTAGAGCCCCATGAAGGAAAG ACAGCGGTGGGGAT
R6	<i>LoAS1</i> -eGFP-R	GAGTATTCTTAGGTGGCAGCGAACGAGCCCCCGTCCATTTCG CCTCAGACGAT
F7	<i>LoAS2</i> -eGFP-F	TTACAACCTCACTCAAGTCCGTTAGAGCCCATGGCATCGTC TTCAGCCTCAATGA
R7	<i>LoAS2</i> -eGFP-R	GAGTATTCTTAGGTGGCAGCGAACGAGCCCCGACGGCCCGA TGCCCCGACCT

1.2.3 实时荧光定量

以东方百合‘索邦’大中小球在低温、常温条件下不同贮藏时期的茎尖 cDNA 为模板，以 *LoActin* 作为基因表达归一化的内参，设计特异性引物（表 1）：*LoActin* 引物 F3、R3，*LoAS1* 引物 F4、R4 和 *LoAS2* 引物 F5、R5。使用荧光定量 PCR 仪（qTOWER3G，德国耶拿）进行 RT-qPCR 实验检测基因表达水平，反应体系如下：SYBR Green Pro Taq HS（避光） 10 μL+ 10×Primer 8 μL+ 10×Temp 2 μL （Total 20 μL），反应程序为：预变性 95 °C，30 s；变性 95 °C，5 s；退火 55 °C，30 s；延伸 72 °C，30 s，循环 40 次，每个样品重复 3 次。所得结果使用 qPCR soft 4.0 软件进行处理，并使用 Graphpad prism 9.5 软件进行绘图。

1.2.4 生物信息学分析

利用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.htm 1) 进行蛋白二级结构预测，利用 <https://web.expasy.org/protparam/> 网站进行蛋白质理化性质分析。

在 NCBI 上 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索得到 *LoAS1* 和 *LoAS2* 的同源基因, 使用 DNAMAN 进行不同物种 AS1、AS2 的氨基酸序列比对, 并使用 MEGA-X 采用邻域连接 (NJ) 算法分析并构建 *LoAS1* 和 *LoAS2* 的系统发育树; 利用 NCBI 分别获取 *LoAS1*、*LoAS2* 及其同源蛋白的保守结构域, 使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 进行保守基序分析, 并利用 Tbtools 进行绘图 (Chen et al., 2023)。

1.2.5 亚细胞定位载体的构建和瞬时表达

根据 AioFFP 载体工具箱说明 (Han et al., 2022), 设计 *LoAS1*、*LoAS2* 的亚克隆引物 F6、R6 和 F7、R7 (表 1), PCR 扩增后, 根据 Uniclone One Step Seamless Cloning Kit (金沙生物) 说明书进行连接转化, 得到 pYL1300-*LoAS1*-eGFP 和 pYL1300-*LoAS2*-eGFP 重组质粒, 转化农杆菌 EHA105 (北京博迈德)。配置重悬液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , pH=5.8) 并将菌体重悬, 黑暗条件静置 2~3 h 后从本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶背注射进行瞬时侵染, 在培养箱中黑暗培养 2 d 后, 在激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8, 德国) 下观测蛋白表达的定位结果。

1.2.6 石蜡切片

东方百合 ‘索邦’ 大球可正常开花, 故选择低温贮藏过程中的大球茎尖进行石蜡切片观察。首先切取 7~8 mm 茎尖组织, 置于 FAA 固定液中常温避光固定。随后依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理及石蜡浸透包埋等前期处理。使用半自动轮转切片机 (Leica RM2245, 德国) 切片, 筛选切片后用番红固绿染色, 并以中性树脂封片。最后在光学显微镜 (Leica DM500, 瑞士) 下观察不同处理组茎尖的解剖学形态特征, 并采用 LAS V4.4 图像采集系统采集照片。

2 结果与分析

2.1 ‘索邦’ *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因的克隆

以东方百合 ‘索邦’ 上部叶和下部叶 cDNA 为混合模板, PCR 扩增获得清晰的片段条带 (图 2)。经纯化回收、连接转化和测序后, 得到 *AS1* 和 *AS2* 基因的编码区序列。*AS1* 编码序列长度为 1 035 bp, 共编码 344 个氨基酸, *AS2* 编码序列长度为 717 bp, 共编码 238 个氨基酸。分别在 NCBI 对 *AS1*、*AS2* 氨基酸序列进行 blastn 检索, 发现 *AS1* 与其他植物中已报道的 *AS1*、*RS2* 和 *PHAN* 蛋白具有较高的相似性; *AS2* 与其他植物中已报道的 *AS2*、*LOB* 家族蛋白相似度较高, 因此可确定二者为东方百合 ‘索邦’ *AS1*、*AS2* 基因, 分别命名为 *LoAS1*、*LoAS2*。

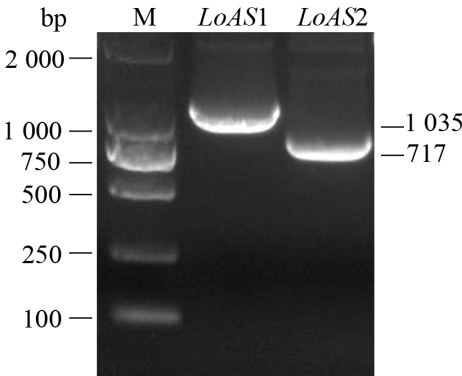


图 2 *LoAS1* 与 *LoAS2* 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *LoAS1* and *LoAS2*

2.2 *LoAS1* 和 *LoAS2* 蛋白质信息分析

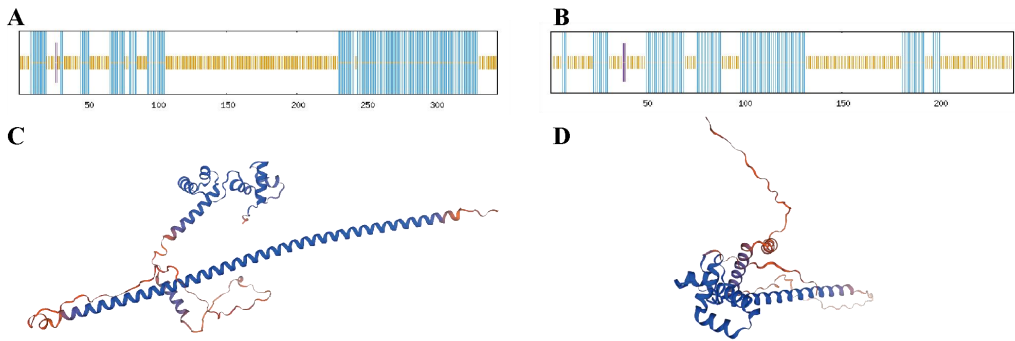
LoAS1 共含有 344 个氨基酸, 蛋白分子式为 $\text{C}_{1742}\text{H}_{2794}\text{N}_{534}\text{O}_{511}\text{S}_{15}$; *LoAS2* 共含有 238 个氨基酸, 蛋白分子式为 $\text{C}_{1085}\text{H}_{1694}\text{N}_{316}\text{O}_{333}\text{S}_{15}$ 。理化性质分析表明 (表 3), *LoAS1* 和 *LoAS2* 均为不稳

定蛋白和亲水性蛋白。利用 SPOMA 对 LoAS1、LoAS2 蛋白的二级结构进行分析,结果显示,LoAS1 蛋白由 43.90%的 α -螺旋 (alpha helix)、0.58%的延伸链 (extended strand) 和 55.52%的无规卷曲组成 (random coil) 组成; LoAS2 蛋白由 39.92%的 α -螺旋 (alpha helix)、0.84%的延伸链 (extended strand) 和 59.24%的无规卷曲 (random coil) 组成。进行 LoAS1 与 LoAS2 蛋白的三级结构预测,同样显示二者结构以 α -螺旋与无规卷曲为主 (图 3)。

表 3 LoAS1 和 LoAS2 蛋白的理化分析

Table 3 Physicochemical analysis of LoAS1 and LoAS2 protein

蛋白 质 Protein	氨基酸数量 Amount of amino acids	分子质量 Molecular mass (kDa)	原子总数 Total atoms	不稳定系数 Coefficient of instability	理论等电 点 Theoretical pI	脂肪系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
LoAS1	344	39.875	5 596	59.21	9.51	71.25	-0.899
LoAS2	238	24.974	3 443	47.68	8.29	69.41	-0.136



A. LoAS1 蛋白二级结构预测; B. LoAS2 蛋白二级结构预测; C. LoAS1 蛋白三级结构预测; D. LoAS2 蛋白三级结构预测。

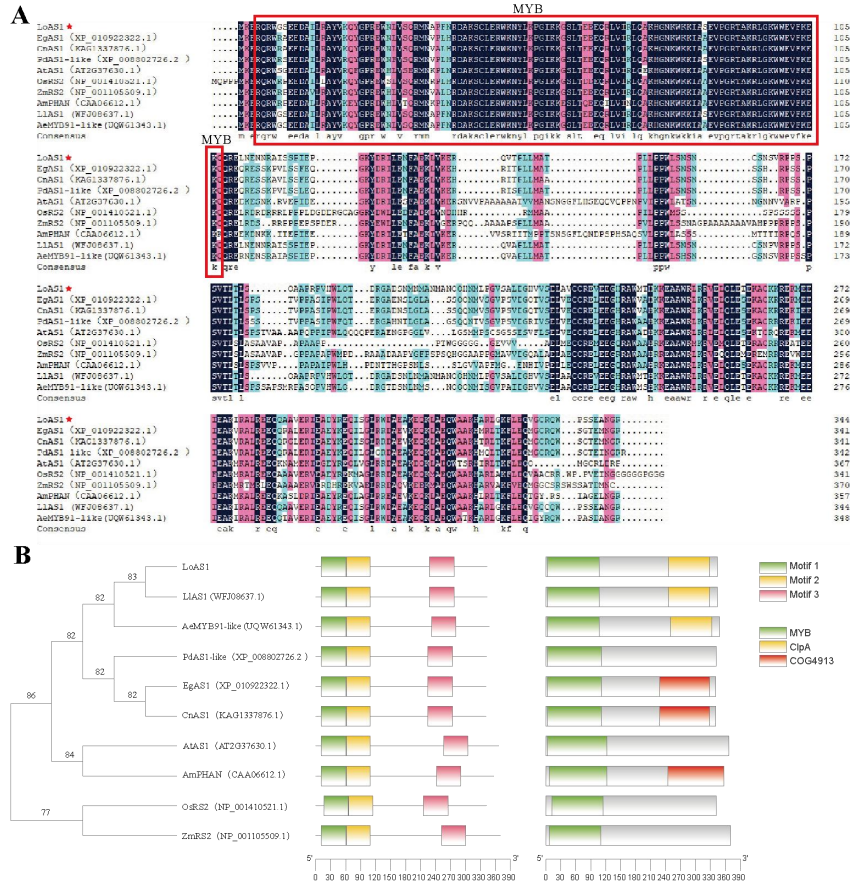
A. LoAS1 protein secondary structure prediction; B. LoAS2 protein secondary structure prediction; C. LoAS1 protein tertiary structure prediction; D. LoAS2 protein tertiary structure prediction.

图 3 LoAS1 与 LoAS2 蛋白结构预测

Fig. 3 LoAS1 and LoAS2 protein structure prediction

2.3 LoAS1 和 LoAS2 同源比对和系统进化分析

使用 DNAMAN 软件对 LoAS1 蛋白序列与 NCBI 已报道的其他植物中 AS1、RS2 和 PHAN 蛋白进行序列比对 (图 4: A), 发现它们都具有保守的 MYB 结构域, 同源性较高, 其中 LoAS1 蛋白 3-107 aa 处为其 MYB 结构域。为进一步探究 LoAS1 与其他植物中 AS1 同源蛋白的亲缘关系, 进行保守结构域、保守基序和进化树的综合绘图 (图 4: B), 结果表明, 它们具有类型和分布相同的 3 种 motif 和同样位于 N 端的 MYB 结构域, LoAS1 还包含和卷丹、老鸦瓣相同的 ATP 结合亚基 ClpA 结构域。这些结果进一步证明了 LoAS1 和其他物种 AS1 的同源性, 并可能发挥与其他物种 AS1 相似的功能。在亲缘关系上, LoAS1 与同为百合科的卷丹、老鸦瓣同源进化关系最近, 和油棕、椰子等单子叶植物亲缘关系相对较近, 和玉米、水稻、拟南芥、金鱼草的亲缘关系相对较远。



注: Lo. 东方百合 ‘索邦’; Eg. 油棕, Cn. 椰子, Pd. 海枣; At. 拟南芥; Os. 水稻(*Oryza sativa*); Zm. 玉米; Am. 金鱼草; Ll. 卷丹; Ae. 老鸦瓣。下同。

Note: Lo. *Lilium* oriental hybrids 'Sorbonne'; Eg. *Elaeis guineensis*; Cn. *Cocos nucifera*; Pd. *Phoenix dactylifera*; At. *Arabidopsis thaliana*; Os. *Oryza sativa*; Zm. *Zea mays*; Am. *Antirrhinum majus*; Ll. *Lilium lancifolium*; Ae. *Amana edulis*. The same below.

A. LoAS1 与不同植物 AS1 氨基酸序列比对; B. LoAS1 同源蛋白的系统进化树及保守基序和结构域分析。

A. Comparison of amino acid sequences of LoAS1 with those of different plants; B. Phylogenetic tree and analysis of conserved motifs and structural domains of LoAS1 homologous proteins.

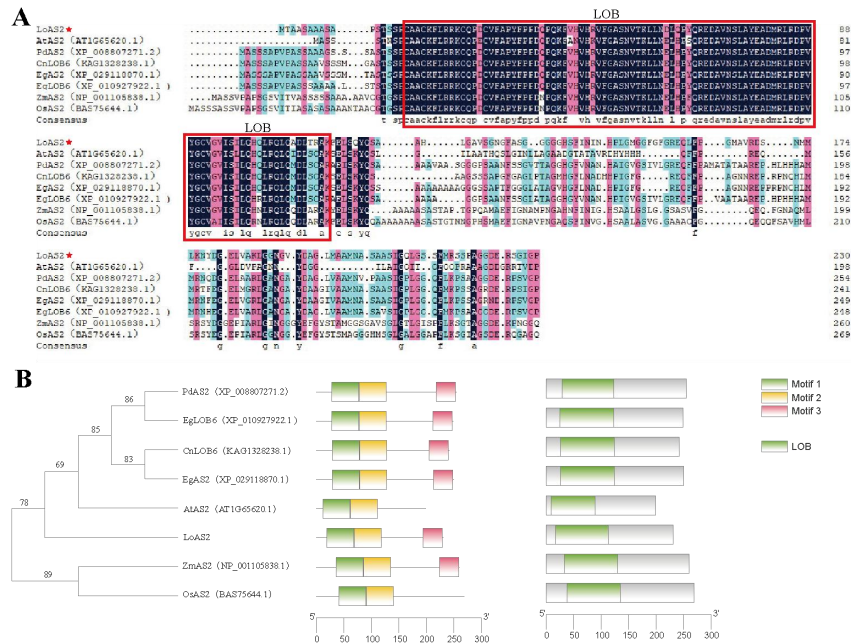
图 4 LoAS1 生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of LoAS1

将 LoAS2 蛋白与 NCBI 已报道的其他植物中 AS2 和 LBD 家族蛋白进行序列比对, 发现它们都具有保守的 LOB 结构域, 同源性较高, 其中 LoAS2 蛋白 24-120 aa 处为 LOB 结构域(图 5: A)。进行保守结构域、保守基序和进化树的综合绘图(图 5: B), 结果显示, LoAS2 与其他植物 AS2 同源蛋白都具有两个相同的保守基序和位于 N 端的 LOB 结构域。这些结果证明了 LoAS2 和其他物种 AS2 的同源性。另外在亲缘关系上, LoAS2 与油棕、椰子、拟南芥等亲缘关系较近, 与玉米、水稻亲缘关系较远。

2.4 LoAS1 和 LoAS2 蛋白的亚细胞定位

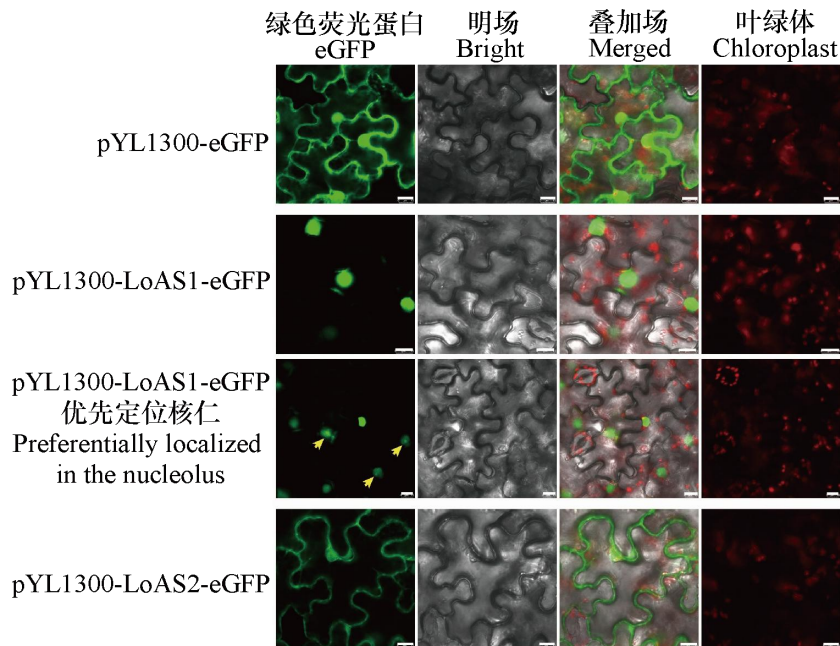
为确定 LoAS1、LoAS2 蛋白在细胞中的表达位置, 利用激光共聚焦显微镜观察其在本氏烟草细胞中的表达位置(图 6)。结果表明, 空载质粒的荧光信号出现在细胞质与细胞核中, LoAS1 主要定位在细胞核中, 与转录因子的核定位特征相符合。另外, 在部分细胞中观察到 LoAS1 在核仁中信号更为强烈, 优先定位于核仁中。而 LoAS2 则表现为核、质定位, 与其他研究中的核定位结果不同。推测 AS2 蛋白可能在百合中发挥不同的作用。



A. LoAS2 与不同植物 AS2 氨基酸序列对比；**B.** LoAS2 同源蛋白的系统进化树及保守基序和结构域分析。
A. Comparison of amino acid sequences of LoAS2 with those of different plants; **B.** Phylogenetic tree and analysis of conserved motifs and structural domains of LoAS2 homologous proteins.

图 5 LoAS2 生物信息学分析

Fig. 5 Bioinformatics analysis of LoAS2



注：比例尺为 10 μm，下同。
 Note: Scale bar = 10 μm, the same below.

图 6 烟草表皮细胞中 LoAS1 和 LoAS2 蛋白的亚细胞定位

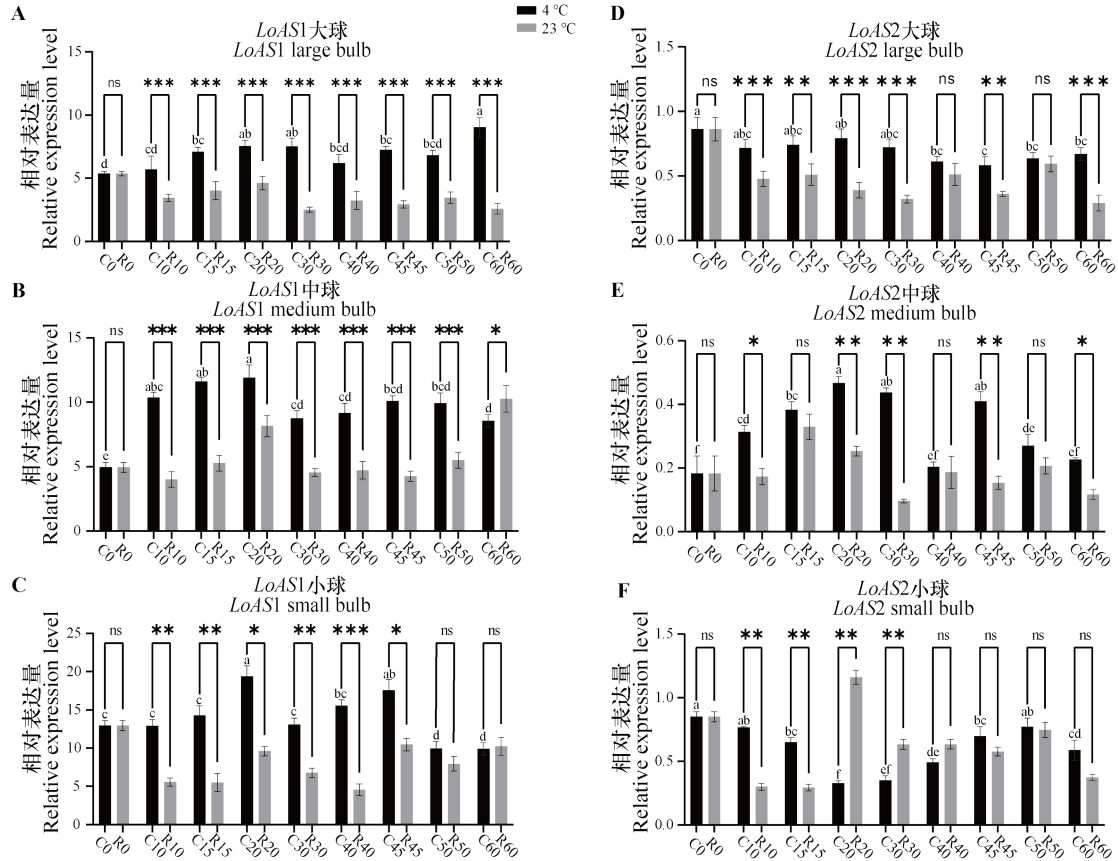
Fig. 6 Subcellular localization of LoAS1 and LoAS2 protein in tobacco epidermal cells

2.5 鳞茎低温贮藏过程中 *LoAS1* 与 *LoAS2* 的表达响应

利用实时荧光定量 PCR，对鳞茎低温贮藏过程中的 *LoAS1* 和 *LoAS2* 进行表达特征分析。在不同规格‘索邦’种球中，低温贮藏后 *LoAS1* 均先上调表达，在 30~40 d 表达量略微下降，而后再

回升；而在常温贮藏中其表达量下降（图 7）。*LoAS2* 在‘索邦’大球贮藏过程中表达量均有下降，但低温条件下的表达量显著高于常温组；在中球中，*LoAS2* 在低温和常温条件下均上调表达，但低温条件下的表达量上升幅度更大，显著高于常温组；在小球中，*LoAS2* 表达量则呈现先下降后上升的趋势（图 7）。

值得注意的是，在大球和中球中，低温 30~40 d 时 *LoAS2* 的表达量均出现下调，与 *LoAS1* 的表达特征相似。另外，低温贮藏 45 d 时，*LoAS1* 和 *LoAS2* 又出现了表达量上调，推测 45 d 可能也是调控过程中一个关键时间节点。



A-C. *LoAS1* 在百合大球、中球和小球低温和常温贮藏过程中表达量变化；D-F. *LoAS2* 在百合大球、中球和小球低温和常温贮藏过程中表达量变化。误差线表示 3 个生物重复的标准差，显著性分析均使用 t 检验，低温和常温组使用*标记，* $0.05 > P \geq 0.01$ ；** $0.01 > P \geq 0.001$ ；*** $0.001 > P$ ；ns：无显著差异；低温组内显著性分析使用字母标记，凡有一个相同标记字母的组别之间，即为差异不显著，凡有不同标记字母的组别之间，即为差异显著。

A-C. Changes in expression of *LoAS1* during cold and ambient storage of large, medium and small lily bulbs; D-F. Changes in expression of *LoAS2* during cold and ambient storage of large, medium and small lily bulbs. The error line indicates the standard deviation of three biological replicates. Significance analyses were performed using t-tests, and the low-temperature and room-temperature groups were labeled using *, $0.05 > P \geq 0.01$; ** $0.01 > P \geq 0.001$; *** $0.001 > P$; ns: no significance. The analysis of significance within cold-temperature groups was performed using letter markers; differences between groups with one of the same marker letter were considered not significant, and differences between groups with different marker letters were considered significant.

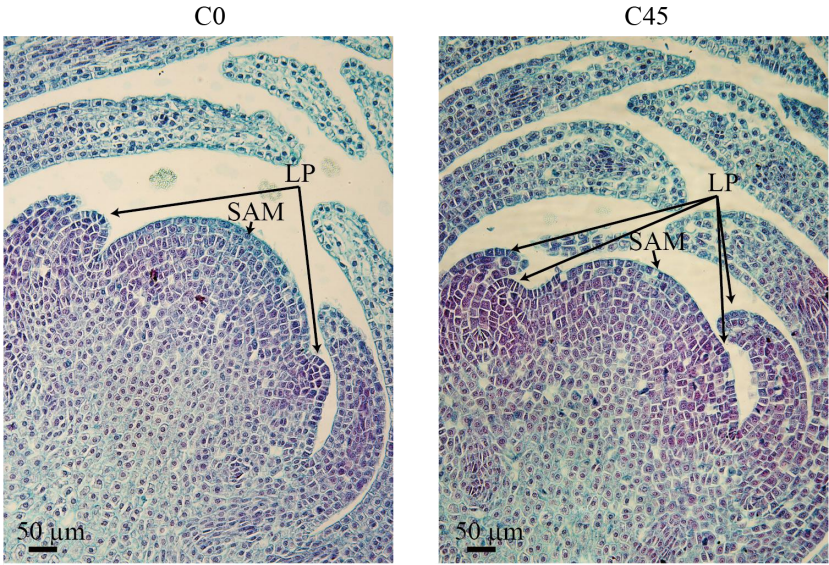
图 7 常温和低温处理不同时间后百合茎尖 *LoAS1* 和 *LoAS2* 的表达

Fig. 7 Expression of *LoAS1* and *LoAS2* in lily stem apex after different times of room temperature and low temperature treatments

2.6 东方百合茎尖石蜡切片观察

对低温贮藏过程中的东方百合‘索邦’大球茎尖进行石蜡切片观察（图 8），结果表明，贮

藏前（C0）SAM（茎尖分生组织）较为凸起，且叶原基较小，而低温贮藏 45 d 时（C45），SAM 开始变平，已有的叶原基不断发育，明显增大增厚，另外还分化出新的叶原基。这与 *LoAS1*、*LoAS2* 在低温贮藏 45 d 内的表达量增高较为吻合，暗示在百合大球中，*LoAS1*、*LoAS2* 可能在鳞茎低温休眠中对侧生原基的发育起到促进作用。



LP. 叶原基；SAM. 茎尖分生组织。

LP. Leaf primordium; SAM. shoot apical meristem.

图 8 东方百合鳞茎低温贮藏期间石蜡切片

Fig. 8 Paraffin sections of oriental lily bulbs during cold temperature storage

3 讨论与结论

百合鳞茎具有内休眠的特性，低温是诱导休眠解除的关键因子。研究表明，鳞茎低温休眠解除过程中芽的侧生原基是动态发育的，但其具体分子机制尚不明确。叶原基的发育和叶形态的建成是一个复杂的过程，牵涉多条通路和多个重要基因，其中 *AS1* 和 *AS2* 是调控该过程的关键因子（Ikezaki et al., 2010; Iwasaki et al., 2013）。前人研究多在模式植物中进行，而本研究以多年生根花卉百合为材料，探索百合鳞茎低温休眠解除过程中 *AS1*、*AS2* 基因在侧生原基发育中的作用。

本研究通过生物信息学分析和亚细胞定位，推测 *LoAS1* 和 *LoAS2* 基因可能参与调控东方百合‘索邦’鳞茎的侧生原基发育。在拟南芥中，MYB 转录因子 *AS1* 可与 LBD 家族蛋白 *AS2* 共同作用，并可与 LHP1（LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1）互作（Li et al., 2016），在叶片发育过程中抑制 *KNOX* 基因的表达（Chuck et al., 1996; Byrne et al., 2000），不仅影响叶原基的形成，还能建立叶片极性（赵方东等，2017）。索邦百合中，*LoAS1* 蛋白与其他植物中 *AS1* 都含有 N 端保守的 MYB 结构域，与卷丹、老鸦瓣的 *AS1* 关系最近。研究表明，卷丹 *LlAS1* 可能促进腋生分生组织的发育，从而促进珠芽的形成（Qu et al., 2024），因此推测 *LoAS1* 也可能在百合侧生器官的发育过程中起调控作用。*LoAS2* 蛋白含有保守的 LOB 结构域，与拟南芥以及油棕、椰子等单子叶植物 *AS2* 蛋白亲缘关系最近。在拟南芥中，LBD 家族基因已被证明参与调控叶原基的发育，并建立分生组织和分化的外侧器官之间的边界（Rong et al., 2024），这提示 *LoAS2* 可能在百合鳞茎侧生器官发育中也发挥相似作用。

前人研究发现，玉米 *AS1* 同源蛋白 *RS2* 定位于细胞核中（Theodoris et al., 2003），拟南芥中 *AS1* 和 *AS2* 两种蛋白质都定位于核体内（Ueno et al., 2007），而拟南芥 *AS1* 在间期细胞中会优先定位于核仁，*AS2* 则优先定位在核质中（Zhu et al., 2008）。*AS2* 还与 *AS1* 在核仁周围小体中共定位，且 *AS2* 小体的形成与其在发育过程中的功能具有高度相关性（Luo et al., 2020）。本研究

中，东方百合‘索邦’的 LoAS1 主要定位于细胞核中，与前人结果较为一致。另外值得关注的是，在部分细胞中，也出现了核仁信号明显强于核质的现象（图 6），推测 LoAS1 可能发挥其他与核仁相关的重要作用，如调节植物的生长发育和生殖、应激感应和细胞活动控制等（Raska et al., 2006; Luo et al., 2022; Lee et al., 2024）。LoAS2 则定位于细胞核和细胞质中，与其他植物中的定位较为不同，推测百合中的 AS2 基因可能以不同的机制发挥作用。另外在本研究中，暂未能观察到 LoAS2 核体的形成，后续可使用精度更高的显微镜进行观察。

AS1 已被报道可能具有响应温度的功能，AS1 和 PIF4(PHYTOCHROME INTERCTING FACTOR 4) 介导的生长素合成和运输过程，共同促进叶片在高温环境下的冷却，从而协调了叶片的恒温性（Park et al., 2019）。拟南芥 *as1* 和 *as2* 突变体中会出现部分叶片近一远轴极性严重缺失，而高温条件下 AS1 和 AS2 的缺失会导致这种畸形的出现率变高，影响叶片的正常发育（Qi et al., 2004）。本研究分析百合低温贮藏过程中 *LoAS1* 和 *LoAS2* 的表达特征发现，与拟南芥中不同，*LoAS1* 和 *LoAS2* 可响应低温上调表达，并在低温贮藏 30~40 d 表达量达到最高。

目前，对于 AS1 和 AS2 基因的功能研究主要集中于促进叶原基发育和叶片极性建立（Byrne et al., 2000; Matsumura et al., 2009, 赵方东等，2017），关于二者是否在百合鳞茎低温休眠解除过程中调控侧生原基发育尚未报道。本研究表明，鳞茎低温贮藏后，*LoAS1* 与 *LoAS2* 的表达量均高于常温组并响应低温上调表达。根据细叶百合低温贮藏过程中的鳞茎石蜡切片的观察，低温 0~48 d 过程中叶原基在不断增大（刘芳等，2015），而在本研究对于东方百合‘索邦’低温贮藏 45 d 的石蜡切片观察中，同样发现叶原基明显增大增厚，而 *LoAS1* 和 *LoAS2* 在鳞茎低温处理前期响应低温上调表达，这表明低温贮藏过程中，*LoAS1* 和 *LoAS2* 的表达动态与叶原基的发育进程相符合，推测二者可能对百合鳞茎休眠解除过程中的侧生器官发育具有重要作用。这将为阐明其在百合鳞茎低温休眠期间侧生原基的形成和发育过程中的调控机制奠定基础，对于阐释多年生植物休眠解除以及不同生活史植物对低温响应策略的多样性提供参考。

参考文献:

- ANDERSON JV, 2015. Advances in plant dormancy [M]. Fargo: Springer International.
- ANDO S, NOMOTO M, IWAKAWA H, et al., 2023. Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 and nucleolar factors are coordinately involved in the perinucleolar patterning of AS2 bodies and leaf development [J]. Plants, 12(20): 3621.
- AZEEZ A, ZHAO Y, SINGH R, et al., 2021. EARLY BUD-BREAK 1 and EARLY BUD-BREAK 3 control resumption of poplar growth after winter dormancy [J]. Nature Communications, 12(1): 1123.
- BYRNE ME, BARLEY R, CURTIS M, et al., 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis [J]. Nature, 408(6815): 967-971.
- CANTON M, FORESTAN C, MARCONI G, et al., 2022. Evidence of chromatin and transcriptional dynamics for cold development in peach flower bud [J]. New Phytologist, 236(3): 974-988.
- CHEN CJ, WU Y, LI JW, et al., 2023. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Molecular Plant, 16(11): 1733-1742.
- CHUCK G, LINCOLN C, HAKE S, 1996. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 8(8): 1277-1289.
- DING YL, SHI YT, YANG SH, 2020. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures [J]. Molecular Plant, 13(4): 544-564.
- FAN XY, YANG Y, LI M, et al., 2021. Transcriptomics and targeted metabolomics reveal the regulatory network of *Lilium davidii* var. *unicolor* during bulb dormancy release [J]. Planta, 254(3): 59.
- GUO MJ, THOMAS J, COLLINS G, et al., 2008. Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis [J]. Plant Cell, 20(1): 48-58.
- HAN JL, MA K, LI HL, et al., 2022. All-in-one: a robust fluorescent fusion protein vector toolbox for protein localization and BiFC analyses in plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 20(6): 1098-1109.
- HAO HP, HE Z, LI H, et al., 2014. Effect of root length on epicotyl dormancy release in seeds of *Paeonia ludlowii*, Tibetan peony [J]. Annals of Botany, 113(3): 443-452.
- HOU LL, XIA YP, HE GF, 2006. Advances in effects of low temperature on bulb dormancy in *Lilium* spp. [J]. Journal of Qinghai University, 24(5): 60-62. [侯玲玲, 夏宜平, 何桂芳, 2006. 低温作用影响百合鳞茎休眠的研究进展 [J]. 青海大学学报, 24(5): 60-62.]
- HUNG FY, FENG YR, HSIN KT, et al., 2023. Arabidopsis histone H3 lysine 9 methyltransferases KYP/SUVH5/6 are involved in leaf development by interacting with AS1-AS2 to repress KNAT1 and KNAT2 [J]. Communications Biology, 6(1): 219.
- IKEZAKI M, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, et al., 2010. Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events [J]. Plant Journal, 61(1): 70-82.
- IWASAKI M, TAKAHASHI H, IWAKAWA H, et al., 2013. Dual regulation of ETTIN (ARF3) gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in Arabidopsis [J]. Development, 140(9): 1958-1969.
- JIN B, DING L, HE XD, et al., 2006. Changes of endogenous hormones during outdoor sowing and cold storage of *Paeonia lactiflora* seeds [J]. Journal of Nanjing Forestry University, (1): 45-48. [金飏, 丁玲, 何小弟, 等, 2006. 芍药种子露地播种和低温贮藏过程中内源激素含量的变化 [J]. 南京林业大学学报, (1): 45-48.]

- LEE S, SEO Y, CHOI J, et al., 2024. Nucleolar actions in plant development and stress responses [J]. *Plant, Cell & Environment*, 47(12): 5189-5204.
- LI YH, 2010. Studies on endogenous hormones changes of lily bulb stored at different cold temperatures for breaking dormancy [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [李翊华, 2010. 百合鳞茎低温解除休眠过程中内源激素的变化研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学.]
- LI ZF, LI B, LIU J, et al., 2016. Transcription factors AS1 and AS2 interact with LHP1 to repress KNOX genes in Arabidopsis [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(12): 959-970.
- LIU F, TIAN ZP, CAI YJ, et al., 2015. Change in starch grains and flower bud differentiation of *Lilium pumilum* bulbs during breaking of dormancy under refrigerated conditions [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 24(9): 154-162. [刘芳, 田忠平, 蔡英杰, 等, 2015. 细叶百合低温解除休眠过程中鳞茎细胞淀粉粒及花芽分化的变化 [J]. *草业学报*, 24(9): 154-162.]
- LIU T, WANG ZQ, WU WB, et al., 2024. Leaf morphogenesis and its effect on crop yield [J]. *Molecular Plant Breeding*, 1-9. [刘涛, 王志淇, 吴文博, 等, 2024. 叶形态建成及对作物产量的影响 [J]. *分子植物育种*, 1-9.]
- LIU YP, 2007. Studies on physiological mechanisms of lily bulb stored at different cold temperatures for breaking dormancy [D]. Harbin: Northeast Forestry University. [刘艳萍, 2007. 百合鳞茎低温解除休眠过程中生理生化变化研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- LUO LL, ANDO S, SAKAMOTO Y, et al., 2020. The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc-finger DNA-binding motif in Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 [J]. *Plant Journal*, 101(5): 1118-1134.
- LUO Y, SHI DQ, JIA PF, et al., 2022. Nucleolar histone deacetylases HDT1, HDT2, and HDT3 regulate plant reproductive development [J]. *Genetics and Genomics*, 49(1): 30-39.
- MACHIDA C, NAKAGAWA A, KOJIMA S, et al., 2015. The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in Arabidopsis [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(6): 655-671.
- MACHIDA Y, SUZUKI T, SASABE M, et al., 2022. Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2): Roles in plant morphogenesis, cell division, and pathogenesis [J]. *Journal of Plant Research*, 135(1): 3-14.
- MAJER C, HOCHHOLDINGER F, 2011. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins[J]. *Trends in Plant Science*, 16(1): 47-52.
- MATSUMURA Y, IWAKAWA H, MACHIDA Y, et al., 2009. Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members [J]. *Plant Journal*, 58(3): 525-537.
- PAN WQ, LI JR, DU YP, et al., 2023. Epigenetic silencing of callose synthase by VIL1 promotes bud-growth transition in lily bulbs [J]. *Nature Plants*, 9(9): 1451-1467.
- PARK Y, LEE H, GIL K, et al., 2019. Developmental programming of thermonastic leaf movement [J]. *Plant Physiology*, 180(2): 1185-1197.
- QI YP, SUN Y, XU L, et al., 2004. ERECTA is required for protection against heat-stress in the AS1/AS2 pathway to regulate adaxial-abaxial leaf polarity in Arabidopsis [J]. *Planta*, 219(2): 270-276.
- QU Y, YANG P, BI M, et al., 2024. Cloning and Functional Characterization of LIAS1 in *Lilium lancifolium*[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43: 4161-4170.
- RASKA I, SHAW P J, CMARKO D, 2006. New insights into nucleolar architecture and activity [J].

- International Review of Cytology, 255: 177-235.
- RONG M, GAO SX, WEN D, et al., 2024. The LOB domain protein, a novel transcription factor with multiple functions: A review[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 214: 108922.
- SCANLON MJ, 2000. Developmental complexities of simple leaves [J]. Current Opinion in Plant Biology, 3(1): 31-36.
- SCHNEEBERGER R, TSIANTIS M, FREELING M, et al., 1998. The rough sheath2 gene negatively regulates homeobox gene expression during maize leaf development [J]. Development, 125(15): 2857-2865.
- SERRANO-CARTAGENA J, ROBLES P, PONCE MR, et al., 1999. Genetic analysis of leaf form mutants from the Arabidopsis information service collection [J]. Molecular and General Genetics, 261(4-5): 725-739.
- SUN Y, ZHOU Q, ZHANG W, et al., 2002. ASYMMETRIC LEAVES1, an Arabidopsis gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves [J]. Planta, 214(5): 694-702.
- THEODORIS G, INADA N, FREELING M, 2003. Conservation and molecular dissection of ROUGH SHEATH2 and ASYMMETRIC LEAVES1 function in leaf development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(11): 6837-6842.
- TIMMERMANS MCP, HUDSON A, BECRAFT PW, et al., 1999. ROUGH SHEATH2: A Myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia [J]. Science, 284(5411): 151-153.
- UENO Y, ISHIKAWA T, WATANABE K, et al., 2007. Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of Arabidopsis [J]. Plant Cell, 19(2): 445-457.
- VIAL-PRADEL S, KETA S, NOMOTO M, et al., 2018. Arabidopsis zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) and two nucleolar proteins maintain gene body DNA methylation in the leaf polarity gene ETTIN (ARF3) [J]. Plant and Cell Physiology, 59(7): 1385-1397.
- WAITES R, HUDSON A, 1995. PHANTASTICA: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus* [J]. Development, 121(7): 2143-2154.
- XU C, LUO F, HOCHHOLDINGER F, 2016. LOB domain proteins: beyond lateral organ boundaries[J]. Trends in Plant Science, 21(2): 159-167.
- ZHAO FD, LI LK, HE XS, et al., 2017. Roles of key genes and relevant plant hormones in the early and late stages of plant embryogenesis [J]. Biotechnology Bulletin, 33(12): 30-36. [赵方东, 李麟坤, 何旭升, 等, 2017. 关键基因和相关激素在植物胚胎发生前后期的作用 [J]. 生物技术通报, 33(12): 30-36.]
- ZHU Y, LI ZY, XU B, et al., 2008. Subcellular localizations of AS1 and AS2 suggest their common and distinct roles in plant development [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 50(7): 897-905.