

引文格式: 张济民, 王浩, 贾文杰, 等. 百合 *LoXTH23* 基因克隆、生物信息学分析及在鳞茎休眠解除过程中的表达动态[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(6): 1041–1048. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202303001](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202303001)

百合 *LoXTH23* 基因克隆、生物信息学分析及在鳞茎休眠解除过程中的表达动态*

张济民¹, 王浩¹, 贾文杰², 孙亮³, 张小平¹, 王有国^{1**}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205;
3. 金华职业技术学院 农学院, 浙江 金华 321016)

摘要: 【目的】研究西伯利亚百合 (*Lilium oriental* ‘Siberia’) 休眠解除过程中 *LoXTH23* 基因的作用。【方法】以西伯利亚百合鳞茎为试验材料, 从前期转录组测序结果中筛选出 1 个休眠解除期差异显著的 *XTH* 家族基因, 利用 RT-PCR 技术扩增该基因 cDNA 全长序列, 命名为 *LoXTH23*。采用生物信息学软件对 *LoXTH23* 基因结构、理化性质等进行分析; 采用荧光定量 PCR 技术测定 *LoXTH23* 基因在鳞茎休眠解除过程中的相对表达量。【结果】*LoXTH23* 基因开放阅读框全长 858 bp, 编码 285 个氨基酸, 包含 GH16 结构域, 属于 *XTH* 家族基因; 编码的蛋白相对分子量约为 3.19 ku, 理论等电点为 6.19, 是存在跨膜结构域和信号肽的不稳定亲水蛋白; 二级结构中以随机卷曲为主, 存在 30 个磷酸化位点; 荧光定量 PCR 结果显示: *LoXTH23* 基因的表达量在鳞茎休眠完全解除 10 d 时最高。【结论】*LoXTH23* 可能在百合鳞茎休眠解除调控进程中起重要作用。

关键词: 百合; *LoXTH23*; 生物信息学分析; 休眠解除

中图分类号: S682.265.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2023) 06-1041-08

Cloning, Bioinformatics Analysis and Expression Dynamics of *LoXTH23* Gene in Bulb Dormancy Release Process of Lily

ZHANG Jimin¹, WANG Hao¹, JIA Wenjie², SUN Liang³, ZHANG Xiaoping¹, WANG Youguo¹

(1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;

3. School of Agriculture, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321016, China)

Abstract: [Purpose] To study the role of *LoXTH23* gene in the process of dormancy release in *Lilium oriental* ‘Siberian’. [Methods] The bulbs of *L. oriental* ‘Siberian’ were used as test materials, and a *XTH* family gene with significant differences in dormancy release period was screened out from the results of pre-transcriptome sequencing, which amplified the full-length sequence of the cDNA by RT-PCR, named *LoXTH23*. Bioinformatics software was used to analyse the structure, physicochemical properties, etc. of the *LoXTH23* gene, and fluorescence quantitative PCR was used to determine the relative expression level of the *LoXTH23* gene in the process of bulb dormancy release.

收稿日期: 2023-03-02

修回日期: 2023-12-07

网络首发日期: 2024-01-10

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060690)。

作者简介: 张济民 (1996—), 男, 河南息县人, 在读硕士研究生, 主要从事观赏园艺植物研究。

E-mail: 1344599300@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 王有国 (1970—), 男, 甘肃山丹人, 博士, 教授, 主要从事园林植物与观

赏园艺研究。E-mail: wyg9988@sohu.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240109.1751.001>



[**Results**] The open reading frame of *LoXTH23* gene was 858 bp in length, encoding 285 amino acids, including GH16 structural domain, and belonging to the XTH family of genes; the relative molecular weight of the encoded protein was about 3.19 ku, and the theoretical isoelectric point was 6.19; it was an unstable hydrophilic protein with the presence of transmembrane structural domains and a signal peptide; random coiling was dominant in the secondary structure, and there were 30 phosphorylation sites. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the expression level of *LoXTH23* gene was the highest at 10 days, when the bulb dormancy was completely released.

[**Conclusion**] *LoXTH23* may play an important role in the regulation of lily bulb dormancy release.

Keywords: lily (*Lilium* spp.); *LoXTH23*; bioinformatics analysis; dormancy release

20 世纪末, 研究人员第 1 次在植物中发现了木葡聚糖水解酶/内转糖苷酶 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, *XTH*) 基因, 它是一类通过催化作用使纤维素/木葡聚糖分子断键重塑, 对植物的纤维素—木葡聚糖结构进行修饰, 进而通过调节细胞壁的弹性和延展性来影响细胞壁发育的关键酶基因^[1-4]。根据序列特征, *XTH* 家族基因被划分为 3 类, 其中 I 类和 II 类 *XTHs* 基因能使木葡聚糖分子产生断键, 生成还原性的末端, 在连接酶作用下再和其他木葡聚糖分子链相连接, 其木葡聚糖内转糖苷酶 (xyloglucan endotransglycosylase, XET) 活性较为明显; 而 III 类 *XTHs* 基因则表现为显著的木葡聚糖水解酶 (xyloglucan endohydrolase, XEH) 活性, 能专一性水解木葡聚糖的 β -1,4 糖苷键。*XTH* 酶的保守序列为 DEIDFEFLG, 该序列存在能够介导催化反应活性的氨基酸残基, 且该催化位点附近的氨基酸残基存在 N-糖基化修饰^[5-8], 其可能与 *XTH* 酶活性存在重大关联。

XTHs 基因在植物生长发育的各个阶段均有表达, 其作用受到广泛关注。*AtXTH31* 基因在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中参与调控根的生长和伸长生长^[9]; *AtXTH* 基因家族的其他基因如 *AtXTH15*、*16*、*17*、*19* 则是通过影响细胞壁伸长生长来调控拟南芥叶柄的长度^[10]; *CaXTH1* 基因在鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* Linn.) 上胚轴中特异性表达, 且其表达量与聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 影响上胚轴发育呈正相关, 因此 *CaXTH1* 基因可能对种子萌发过程中上胚轴的伸长具有重要作用^[11]; *GmXTH38* 基因通过调控脯氨酸与超氧化物歧化酶含量在大豆 (*Glycine max*) 抗干旱胁迫中起到重要作用^[12]; *OsXTH* 基因家族在水稻

(*Oryza sativa*) 抗干旱胁迫中起到关键作用^[13]; 而在拟南芥中超表达 *XTH* 家族基因可以明显检测出 XEH 酶活性增强以及细胞壁结构发生变化, 且超表达植株叶形显著区别于野生型植株^[14-15]。此外, PAN 等^[16]通过转录组测序发现: *XTHs* 基因在天麻种子休眠解除中呈差异性表达, 可能在这一过程中起到重要作用; MA 等^[17]研究发现: 在龙眼种子发育的早期, *XTHs* 类基因扮演着关键角色。可见, *XTHs* 基因在植物的生长发育以及植物响应逆境胁迫方面具有重要作用, 但对于 *XTHs* 类基因在休眠中如何起作用, 尤其是在百合种球休眠中的作用尚不清楚。

百合 (*Lilium* spp.) 是百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 多年生草本球根植物, 其花色丰富、气味芳香而深受消费者喜爱, 是世界上主要的鲜切花之一。由于百合鳞茎的休眠特性, 即休眠解除过度或解除不彻底, 将会影响百合成花质量, 导致其鲜切花品质和产量双重下降, 造成巨大的经济损失, 因此, 百合在生产上一直受限于种球休眠解除不整齐等因素, 无法周年供应^[18], 限制了其产业发展。因此, 探究百合种球的休眠机制具有重要意义。课题组前期的转录组分析发现 *LoXTH23* 基因与百合鳞茎的休眠解除密切相关, 本试验使用 RT-PCR 克隆西伯利亚百合 *LoXTH23* 基因, 利用生物信息学软件对该基因进行序列分析, 以期研究 *LoXTH23* 基因对百合鳞茎解除休眠的作用机制提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料、试剂和设备

供试材料: 西伯利亚百合小鳞茎, 繁殖于云南农业大学试验基地。选取生长状态良好、大小

一致、鲜质量小于 0.4 g 的百合小鳞茎平均分成 2 组, 每组 30 个 (含 3 次重复), 其中一组用蒸馏水浸泡 2 h 处理 (CK), 另一组用 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙烯溶液浸泡 2 h 处理 (预试验显示该浓度乙烯处理的百合小鳞茎先于对照组萌发)。处理完毕后用吸水纸吸干, 将小鳞茎接种到琼脂作为基质的玻璃瓶中, 每瓶接种 5 个小鳞茎; 然后将其置入 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中黑暗培养 30 d, 取出材料后保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

主要试剂: 植物总 RNA 快速提取试剂盒购自北京华越洋生物科技有限公司; 反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒和 DL 2000 DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Taq* PCR Mix 预混液和克隆载体 PESI-T 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 大肠杆菌感受态 DH5 α 由昆明硕擎生物技术有限公司提供; 核酸染料 Green 和限制性内切酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其他试验药品均为国标分析纯或生物纯, 购自源叶生物 (上海) 股份有限公司。

主要设备仪器: HC-3018R 高速冷冻离心机; Nanodrop2000 超微量分光光度计; Bio-Rad PCR 仪; GSP-9160MBE 恒温培养箱; DYY-7C 电泳仪; TU-1810 暗箱式紫外透射仪; THZ-C 恒温振荡器。

1.2 试验方法

1.2.1 百合小鳞茎总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

使用总 RNA 快速提取试剂盒提取百合小鳞茎总 RNA; 使用 cDNA 第 1 链合成试剂盒进行反转录, 使用 Nanodrop2000 超微量分光光度计检测样品浓度, 检测合格的 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.2 *LoXTH23* 基因克隆

依据课题组前期转录组筛选的 *LoXTH23* 基因序列, 使用 Primer Premier 5 软件以及 NCBI 引物设计工具设计 RT-PCR 引物和 qRT-PCR 引物, 以 *Actin* 基因作为内参基因 (表 1)^[9]。引物由昆明硕擎生物技术有限公司合成。

以 cDNA 第 1 链为模板进行扩增, PCR 反应体系为 50 μL , 包括 cDNA 模版 1 μL , 正、反向引物各 1 μL , *Taq* PCR Mix 预混液 25 μL , 去离子水 22 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物 primer	序列 (5'→3') sequence
<i>LoXTH23</i> -F	AGGCAAGGAACACTCTGCTG
<i>LoXTH23</i> -R	CCACCACTGCAACAATGACT
<i>LoXTH23</i> -qF	CGAACCAGAGGAAGAACTGC
<i>LoXTH23</i> -qR	CTCAGCAGGCACAGTTACCA
<i>Actin</i> -F	TCGCCTACATCGCTAACC
<i>Actin</i> -R	TTCCCAATAATCGCAAGACC

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。将 PCR 纯化产物连接至 pESI-T 载体上, 将 10 μL 连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 经由蓝白斑筛选、菌液 PCR 及双酶切验证筛选阳性克隆, 将阳性质粒送至昆明硕擎生物技术有限公司进行测序验证。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

以对照组和处理组百合小鳞茎各个时期以及不同组织的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 次循环; 溶解曲线制作: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量分析法计算 *LoXTH23* 基因的相对表达量。

1.2.4 生物信息学分析

采用生物信息学软件对 *LoXTH23* 基因结构和理化性质等进行分析。基因开放阅读框采用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测; 在 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行序列比对和同源序列搜索; 蛋白质的物理和化学性质采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测; 蛋白质的亲水性和疏水性采用 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 预测; 蛋白跨膜区域采用 TMHMM Server v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测; 蛋白质信号肽采用 SignalP 3.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-3.0>) 预测; 蛋白质的亚细胞定位采用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测; 蛋白质的保守结构域采用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析; 蛋白质的二级结构采用 Expasy (<https://www.expasy.org/>) 预测; 蛋白质的三维结构采用 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测; 采

用 Net Phos (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 预测磷酸化位点; 采用 MEGA 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 *LoXTH23* 基因克隆及测序结果

成功克隆并获得 *LoXTH23* 基因全长序列的目的条带, 经电泳检测, 扩增片段 1 104 bp, 与目标条带一致 (图 1); 测序序列通过 NCBI ORF Finder 预测显示: 开放阅读框全长 858 bp, 编码 285 个氨基酸 (图 2)。

2.2 *LoXTH23* 基因所编码蛋白的理化性质

LoXTH23 基因编码的氨基酸残基序列中存在 1 个典型的保守 GH16 结构域, 证实 *LoXTH23* 蛋白属于 XTH 家族成员蛋白 (图 3)。

LoXTH23 蛋白质分子质量约为 3.19 ku, 理论等电点为 6.19, 分子式为 $C_{1436}H_{2155}N_{377}O_{430}S_{10}$, 总原子数为 4 408。由 20 种氨基酸组成, 其中亮氨酸和丝氨酸含量最丰富; 甲硫氨酸和谷氨酸含量最低。带正电荷的残基 (Arg+Lys) 总数为 21, 带负电荷的残基 (Asp+Glu) 总数为 23, 该蛋白的不稳定指数为 40.29; 脂肪系数为 70.53, 总平均亲水性为-0.378。

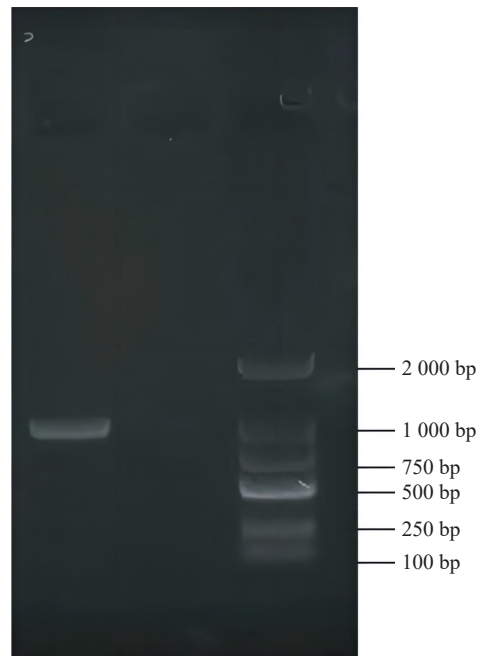


图 1 *LoXTH23* 的 PCR 产物
Fig. 1 PCR product of *LoXTH23*

2.3 *LoXTH23* 蛋白的疏水性

LoXTH23 基因编码的氨基酸中存在较多区段处于 0 刻度线以下 (图 4), 表明该序列中亲水性氨基酸残基的数量多于疏水性氨基酸残基, 为不稳定的亲水蛋白。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGACTCTCTCTGGTTCCCTTACTACCTTGCTCTCTCTGTTAGCAGCTGCCAGCCTCATCAACCAAGCTCAGAGCAGCCTCCCTCAAGAC								
1	M T L S G S L L P L L S L L A A A S L I N Q A Q S S L P Q D								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	CTTGACATAAATGGGGTGACGGCCGCGCAAGTTCCTAGACAACGGTCAGCTCCTCACCCCTCTCGCTCGATCACTACTCCGGCTCCGGC								
31	L D I T W G D G R G K F L D N G Q L L T L S L D H Y S G S G								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
181	TTTCAGTCTAAGAACCAATATCTCTTTGGCCAAATTGATATGCAGATCAAGCTCGTCCAGGGCAACTCAGCAGGCACAGTTACACCTTC								
61	F Q S K N Q Y L F G Q I D M Q I K L V Q G N S A G T V T T F								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
271	TATCTCTCGTCACAAGGCCCAACCATGACGAGCTCGACTTCGAGTTCCCTCGGCAACGTCACCGGCCAACCTTACACCATCCATACCAAC								
91	Y L S S Q G P N H D E L D F E F L G N V T G Q P Y T I H T N								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
361	GTGTTACACAAGGCAAGGGCAACAGAGAGCAGCAGTCTCTCTCTGTTTCGACCCCACTGGACTTCCATACCTACTCCATCTCTGG								
121	V F T Q G K G N R E Q Q F F L W F D P T L D F H T Y S I L W								
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
451	AACCCCAAATATCATATTTCTGTCGATGGAAGTCCATTAAGAGTTTCAAGAAATCATGAAGCCAACAACATCCCCTTCCCAAAACAAA								
151	N P Q N I I F S V D G T P L R V F K N H E A N N I P F P N K								
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
541	CAGCCCATGAGGATGTAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT								
181	Q P M R M Y S S L W D A E D W A T R G G L V K T D W T K A P								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
631	TTCACGGCTTCTATCAGGGTTATAATGCTGAAGCTTGTGTGCTCCTCGGTCGCTCGTATGCGGGTCTACGCCAGGTCACAGAAC								
211	F T A S Y Q G Y N A E A C V W S S G A S S C G S T P R S Q N								
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
721	GGTTGGTTCAGCCAAAGGGCTGAATTTCTGTGAGCCAGGGAAGGCTGGCTGGGTGCAGAAAAATTATGATCTACAACATTATTGTAAGGAT								
241	G W F S Q G L N S V S Q G R L A W V Q K N Y M I Y N Y C K D								
	820	830	840	850					
811	CTGAAGCGATTCCCCCAAGGACTGCCAGCAGAGTGTTCCTTGCTGCCTGA								
271	L K R F P Q G L P A E C S L P *								

图 2 *LoXTH23* 基因序列及其编码的氨基酸
Fig. 2 *LoXTH23* gene sequence and its encoded amino acid

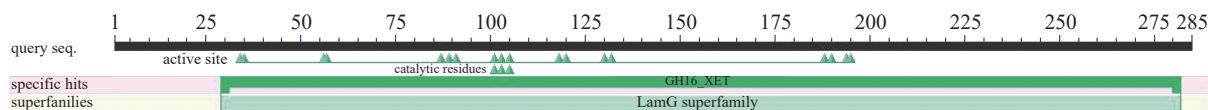


图 3 *LoXTH23* 基因编码蛋白质的保守域

Fig. 3 Conserved domain of *LoXTH23* gene encoded protein

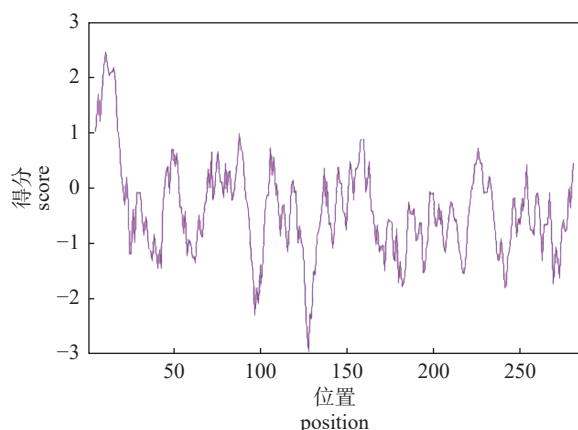


图 4 *LoXTH23* 蛋白的疏水性预测

Fig. 4 Hydrophobic prediction of *LoXTH23* protein

2.4 *LoXTH23* 蛋白的跨膜区及亚细胞定位

LoXTH23 蛋白序列的跨膜螺旋数量为 0, 预测跨膜螺旋的氨基酸残基数量为 0.150640; 该蛋白质的前 60 个氨基酸残基中预测的跨膜螺旋氨基酸残基数量为 0.149520, N-端位于细胞质侧膜的总概率为 0.008960, 接近于 0。预测整个蛋白质为膜外蛋白的概率超过 1, 而为膜内蛋白和跨膜蛋白的概率为 0 (图 5)。预测 *LoXTH23* 蛋白定位于细胞外基质和液泡的分值分别为 7 和 4, 表明 *LoXTH23* 蛋白可能定位于细胞外基质。

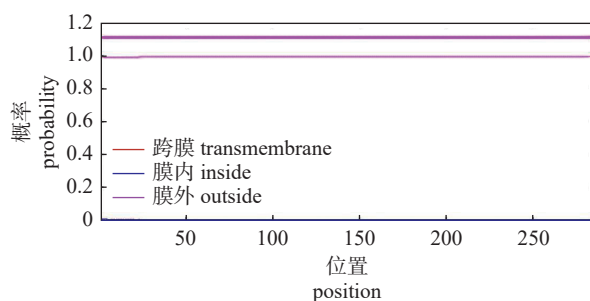


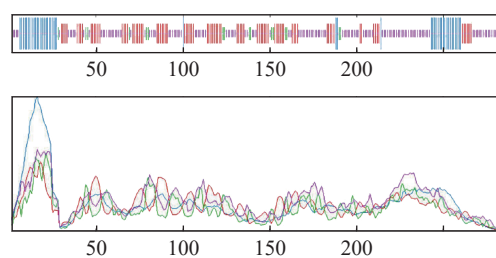
图 5 *LoXTH23* 蛋白跨膜结构预测

Fig. 5 Prediction of the transmembrane structure of *LoXTH23* protein

2.5 *LoXTH23* 蛋白的二级和三级结构

LoXTH23 蛋白的二级结构预测结果 (图 6) 显示: 该蛋白包含有 4 种二级结构, 包括 44 个氨

基酸形成的 α -螺旋 (占 15.44%)、88 条延伸链 (占 30.88%)、16 个氨基酸形成的 β -转角 (占 5.61%) 和 137 条随机卷曲 (占 40.87%), 因此, 该蛋白的主要结构为随机卷曲; 其三级结构预测结果 (图 7) 显示: 该蛋白三维模型主要以无规则卷曲为主, 符合二级结构预测结果。



注: 蓝色代表 α -螺旋; 绿色代表 β -转角; 红色代表延伸链; 紫色代表随机卷曲。

Note: Blue indicates α -helix; green indicates β -turn; red indicates extended strand; purple indicates random.

图 6 *LoXTH23* 蛋白二级结构预测

Fig. 6 Prediction for the secondary structure of *LoXTH23* protein

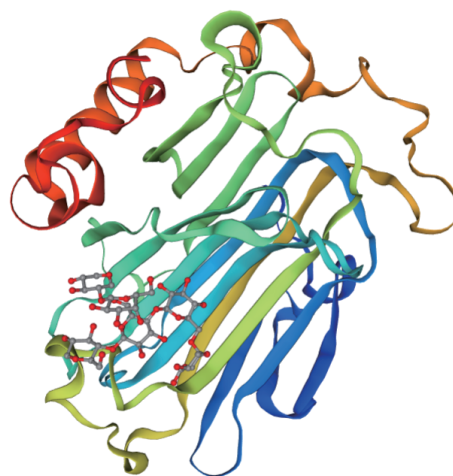
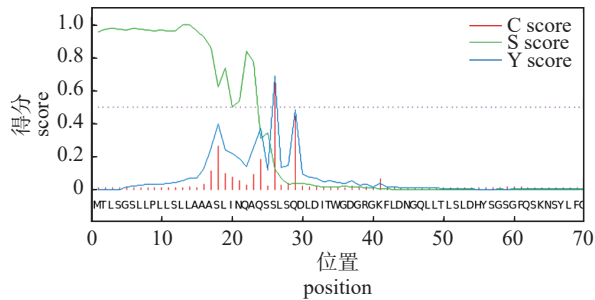


图 7 *LoXTH23* 蛋白的三级结构预测

Fig. 7 Prediction for the tertiary structure of *LoXTH23* protein

由图 8 可知: *LoXTH23* 基因编码蛋白的氨基酸残基原始剪切位点的最大值为 0.663, 信号肽最大值为 0.684, 综合剪切位点最大值为 0.997, 平均信号肽分值为 0.840。



注: C score. 剪切位点分值; S score. 信号肽分值; Y score. C 和 S 的综合分值; 粉色虚线表示设定阈值。

Note: C score. cleavage site score; S score. signal peptide score; Y score. combined score of C and S; the pink dotted line represents the set threshold.

图 8 LoXTH23 蛋白的信号肽预测

Fig. 8 Signal peptide prediction of LoXTH23

2.6 LoXTH23 蛋白磷酸化位点

预测 LoXTH23 蛋白磷酸化位点为 30 个, 其中丝氨酸位点最多 (20 个), 表明该蛋白磷酸化位点以丝氨酸为主 (图 9)。

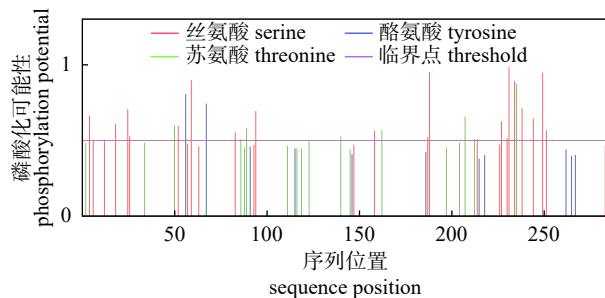


图 9 LoXTH23 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 9 Phosphorylation site prediction of LoXTH23 protein

2.7 LoXTH23 基因的系统发育树

由图 10 可知: 百合的 *LoXTH23* 与油棕 (*Elaeis guineensis*) 聚为一类, 在进化上有一定的同源性,

二者亲缘关系较近; 与银白杨 (*Populus alba*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的亲缘关系较远。

2.8 LoXTH23 基因在小鳞茎不同休眠时期和不同组织的表达量

由图 11 可知: 试验 0 d 时, *LoXTH23* 基因在百合小鳞茎中的相对表达量开始升高, 并在 10 d 时相对表达量达到最高; 该基因在根和小鳞茎中的表达量高于其他组织, 在茎中的表达量最低。

3 讨论

随着生活水平和质量的提高, 人们对观赏植物的需求也在上升。百合作为重要的观赏植物, 生产受到其休眠期的影响。*XTH* 基因广泛存在于植物中, 通过调节半纤维素的合成影响细胞壁刚性, 进而影响细胞行使功能及植物对逆境和生长发育的响应^[20-23], 是植物形态建成的重要参与者之一。相关研究表明: *XTH* 基因家族也在种子休眠中起到重要作用, 如: *XTH23* 基因在龙眼的胚胎早期发育过程中起重要作用^[17]; 天麻的休眠解除与 *XTHs* 基因家族密切相关^[16]。因此, 分析 *XTH* 家族相关基因在百合鳞茎休眠中的作用及其作用机理, 对深入了解百合鳞茎休眠机制和培育百合新品种具有重要意义。

本研究从百合小鳞茎中克隆得到 1 个与休眠解除相关的基因 *LoXTH23*, 其开放阅读框全长 858 bp, 编码 285 个氨基酸, 含有 1 个典型的保守 GH16 结构域; *LoXTH23* 蛋白带负电荷残基数量大于带正电荷残基数量, 其亚细胞主要定位于细胞质基质外, 是 1 个存在信号肽、能引导蛋白质

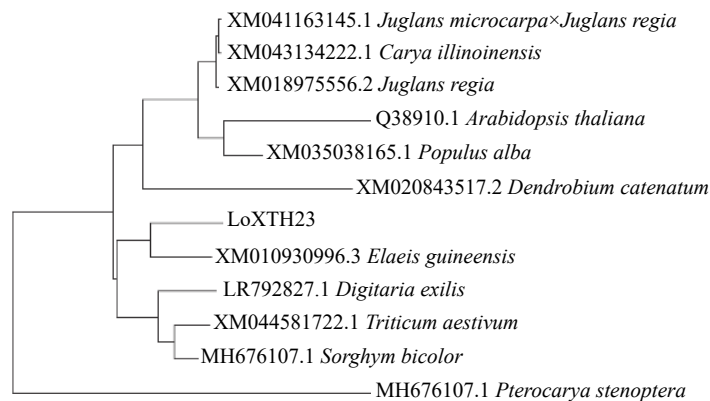


图 10 LoXTH23 的系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree of LoXTH23

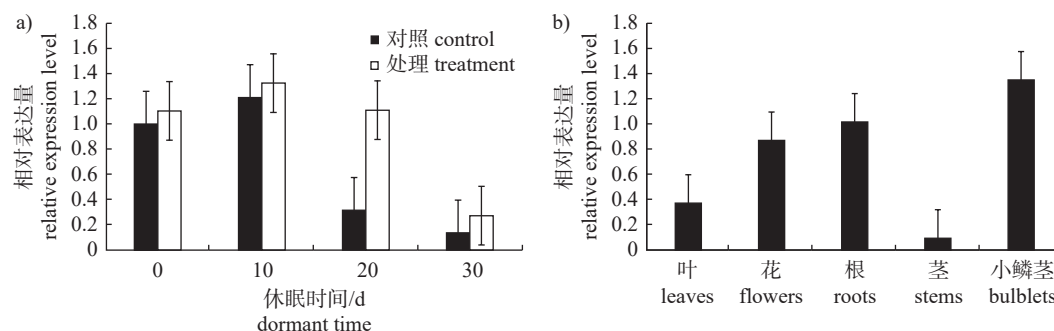


图 11 *LoXTH23* 基因在小鳞茎不同休眠时期 (a) 和不同组织中 (b) 的表达量

Fig. 11 Expression levels of *LoXTH23* gene in different dormant periods of small bulbs (a) and different tissues (b)

跨膜运输的分泌型蛋白; 该蛋白与油棕的同源蛋白聚成一簇, 表明这 2 个蛋白之间具有较强的亲缘关系。大豆同源基因 *GmXTH23* 亚细胞定位在细胞膜上, 这可能是不同物种之间的差异所造成的^[24]; 也有研究表明: 细胞外基质存在大量信号分子, 对细胞的生长发育及增殖具有重要作用^[25], 推测百合 *LoXTH23* 也存在类似功能。该结果为进一步研究 *LoXTH23* 基因在百合种球休眠中的功能奠定了基础。

课题组通过前期转录组数据分析百合种球响应外界乙烯信号诱导解除休眠的过程, 并发现 *LoXTH23* 基因呈差异性表达; 本研究进一步发现: 经乙烯溶液处理后, *LoXTH23* 基因在鳞茎开始萌发时的表达量显著上调, 表明该基因在百合种球打破休眠时起重要作用; 第 10 天时 *LoXTH23* 基因的表达量最高, 推测该基因可能是响应乙烯调控, 通过促进细胞壁伸长而促进根系生长, 从而在小鳞茎萌发前期起作用。İŞKIL 等^[26]研究证实: 外界胁迫下, 拟南芥 *XTH* 家族基因, 特别是 *AtXTH23* 促进了拟南芥根系的生长, 这与本研究结果相似, 但该基因如何参与调控百合鳞茎细胞壁的生理活动、在休眠信号通路上起到何种作用等具体功能还需进一步研究。

4 结论

LoXTH23 基因可能在西伯利亚百合小鳞茎休眠解除调控进程与萌发中起重要作用。

[参考文献]

- [1] FARKAS V, SULOVA Z, STRATILOVA E, et al. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992, 298(2): 365. DOI: [10.1016/0003-9861\(92\)90423-T](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90423-T).
- [2] FRY S C, SMITH R C, RENWICK K F, et al. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants[J]. Biochemical Journal, 1992, 282(3): 828. DOI: [10.1042/bj2820821](https://doi.org/10.1042/bj2820821).
- [3] NISHITANI K, TOMINAGA R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(29): 21064. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)36797-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36797-3).
- [4] COSGROVE D J. Growth of the plant cell wall[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(11): 861. DOI: [10.1038/nrm1746](https://doi.org/10.1038/nrm1746).
- [5] BAUMANN M J, EKLOF J M, MICHEL G, et al. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism[J]. The Plant Cell, 2007, 19(6): 1963. DOI: [10.1105/tpc.107.051391](https://doi.org/10.1105/tpc.107.051391).
- [6] SALADIÉ M, ROSE J K C, COSGROVE D J, et al. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action[J]. The Plant Journal, 2006, 47(2): 282. DOI: [10.1111/j.1365-3113.2006.02784.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02784.x).
- [7] KALLAS A M, PIENS K, DENMAN S E, et al. Enzymatic properties of native and deglycosylated hybrid aspen (*Populus tremula*×*tremuloides*) xyloglucan endotransglycosylase 16A expressed in *Pichia pastoris*[J]. Biochemical Journal, 2005, 390(1): 105. DOI: [10.1042/BJ20041749](https://doi.org/10.1042/BJ20041749).
- [8] VAN SANDT V S T, GUISEZ Y, VERBELEN J P, et al. Analysis of a xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) from the lycopodiophyte *Selaginella kraussiana* suggests that XTH sequence characteristics and function are highly conserved during the evolution of vascular plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(12): 2922. DOI: [10.1093/jxb/erl064](https://doi.org/10.1093/jxb/erl064).
- [9] LIU Y B, LU S M, ZHANG J F, et al. A xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in *Ara-*

- bidopsis*[J]. *Planta*, 2007, 226(6): 1560. DOI: [10.1007/s00425-007-0591-2](https://doi.org/10.1007/s00425-007-0591-2).
- [10] SASIDHARAN R, CHINNAPPA C C, STAAL M, et al. Light quality-mediated petiole elongation in *Arabidopsis* during shade avoidance involves cell wall modification by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 990. DOI: [10.1104/pp.110.162057](https://doi.org/10.1104/pp.110.162057).
- [11] SILVIA R, TERESA J, EMILIA L, et al. The gene for a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase from *Cicer arietinum* is strongly expressed in elongating tissues[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(2): 169. DOI: [10.1016/j.plaphy.2005.01.014](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.014).
- [12] 张亚楠, 王婷, 欧斯艳, 等. 大豆响应低磷胁迫的 *XTH* 基因鉴定及 *XTH38* 调节根系生长研究[J]. *植物营养与肥料报*, 2022, 28(7): 1181. DOI: [10.11674/zwf.2021562](https://doi.org/10.11674/zwf.2021562).
- [13] HE H, RACHID S, YANG Q. Changes in *OsXTH* gene expression, ABA content, and peduncle elongation in rice subjected to drought at the reproductive stage[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31(4): 749. DOI: [10.1007/s11738-009-0287-2](https://doi.org/10.1007/s11738-009-0287-2).
- [14] GENOVESI V, FORMALÉ S, FRY S C, et al. ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(4): 875. DOI: [10.1093/jxb/ern013](https://doi.org/10.1093/jxb/ern013).
- [15] CHO S K, KIM J E, PARK J A, et al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(13): 3136. DOI: [10.1016/j.febslet.2006.04.062](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.062).
- [16] PAN C L, YAO L X, YU L Y, et al. Transcriptome and proteome analyses reveal the potential mechanism of seed dormancy release in *Amomum tsaoko* during warm stratification[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 99. DOI: [10.1186/S12864-023-09202-X](https://doi.org/10.1186/S12864-023-09202-X).
- [17] MA X W, CHEN Y, LIU M Y, et al. Genome-wide analysis of the XTH gene family and functional analysis of *DLXTH23.5/25* during early longan somatic embryogenesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1043464. DOI: [10.3389/fpls.2022.1043464](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1043464).
- [18] 王浩, 孙亮, 贾文杰, 等. 百合 AP2/ERF 家族转录因子基因 *LoERF4* 的克隆和生物信息学分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(6): 1030. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202111078](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202111078).
- [19] 梁蕤, 徐雷锋, 毕蒙蒙, 等. 柠檬色百合实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(2): 73. DOI: [10.11841/j.issn.1007-4333.2023.02.06](https://doi.org/10.11841/j.issn.1007-4333.2023.02.06).
- [20] HAYASHI T, KAIDA R. Functions of xyloglucan in plant cells[J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(1): 24. DOI: [10.1093/mp/ssq063](https://doi.org/10.1093/mp/ssq063).
- [21] EDELMANN H G, FRY S C. Effect of cellulose synthesis inhibition on growth and the integration of xyloglucan into pea internode cell walls[J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(2): 993. DOI: [10.1104/pp.100.2.993](https://doi.org/10.1104/pp.100.2.993).
- [22] CAVALIER D M, LEROUXEL O, NEUMETZLER L, et al. Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(6): 1519. DOI: [10.1105/tpc.108.059873](https://doi.org/10.1105/tpc.108.059873).
- [23] VISSENBERG K, FRY S C, PAULY M, et al. XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412): 673. DOI: [10.1093/jxb/eri048](https://doi.org/10.1093/jxb/eri048).
- [24] 陈龙, 张沿政, 李永光, 等. *GmXTH23* 基因的克隆及抗旱性鉴定[J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42(5): 905. DOI: [10.13836/j.jjau.2020101](https://doi.org/10.13836/j.jjau.2020101).
- [25] MIRANTI C K, BRUGGE J S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction[J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(4): E83. DOI: [10.1038/ncb0402-e83](https://doi.org/10.1038/ncb0402-e83).
- [26] İŞKIL R, SURGUN-ACAR Y. Expression analysis of cell wall assembly and remodelling-related genes in *Arabidopsis* roots subjected to boron stress and brassinosteroid at different developmental stages[J]. *Acta Botanica Brasilica*, 2018, 32(7): 1. DOI: [10.1590/0102-33062018abb0023](https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0023).

责任编辑: 何馨成