

刘佳鑫, 武琼, 韩美玲, 等. 百合 GARP 家族鉴定和鳞片发育的基因克隆与表达[J]. 山西农业科学, 2025, 53(1): 111-118.
LIU J X, WU Q, HAN M L, et al. Identification of GARP transcription factor family in *Lilium* and cloning and expression analysis of bulb development related genes[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(1): 111-118.
doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2025.01.12

百合 GARP 家族鉴定和鳞片发育的基因克隆与表达

刘佳鑫¹, 武琼², 韩美玲¹, 李超³, 杜方¹

(1. 山西农业大学 城乡建设学院, 山西 晋中 030801; 2. 山西农业大学 园艺学院, 山西 晋中 030801;
3. 山西禾田悦农业技术服务有限公司, 山西 吕梁 033000)

摘要: GARP 是植物特异性转录因子家族, 在植物生长发育和非生物胁迫响应中发挥关键作用。为全面了解百合 GARP 转录因子提供基础资料, 为探索百合鳞片的生长发育机制奠定一定基础, 基于二代、三代百合转录组数据, 对其 GARP 家族成员进行鉴定和表达分析。结果表明, 在转录组数据中共鉴定出 34 个 GARP 蛋白, 均为亲水性蛋白, 68% 为酸性蛋白, 94% 为不稳定蛋白。系统进化树将百合 GARPs 分为 5 个亚家族: ARR-B、GLK、NIGT1/HRS1/HHO、PHR1/PHL1 和 KAN, 进化分析发现, 百合 GARPs 可能参与生长发育、生物钟调节、开花转化、激素运输、非生物胁迫等过程。对鳞片发育具有重要作用的 ARR-B 亚家族成员进行 qRT-PCR 分析, 结果发现, *LhGARP33*、*LhGARP30* 和 *LhGARP3* 可能对鳞茎发育起重要作用。*LhGARP3* 和 *LhGARP30* 被成功克隆, 氨基酸序列具有典型的 ARR-Bs 磷酸受体结构域(REC)及金属和磷酸化结合位点。空间表达分析了 ARR-B 亚组在花、叶和鳞片中的表达模式, 结果表明, *LhGARP5* 在叶中的表达量最高, 而 *LhGARP31* 在花中的表达量最高, *LhGARP33*、*LhGARP30* 和 *LhGARP3* 的表达特征基本一致, 均在鳞片中高表达, 其可能作为关键基因在鳞片发育过程中发挥主要作用。

关键词: 百合; GARP 家族; 鳞片发育; 实时荧光定量 PCR; 基因克隆

中图分类号: S686.2⁺⁹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2025)01-0111-08

Identification of GARP Transcription Factor Family and Cloning and Expression of Bulb Development Related Genes in *Lilium*

LIU Jiixin¹, WU Qiong², HAN Meiling¹, LI Chao³, DU Fang¹

(1. College of Urban and Rural Construction, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;
2. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;
3. Shanxi Hetianyue Agricultural Technology Service Co., Ltd., Lüliang 033000, China)

Abstract: GARP is a plant specific transcription factor family and plays a key role in plant growth, development, and abiotic stress response. In order to provide basic information for a comprehensive understanding of GARP transcription factors in *Lilium*, and laid a foundation for exploring the growth and development mechanism of bulbs in *Lilium*, in this study, based on the transcriptome data of Next-generation sequencing and Third-generation sequencing of *Lilium*, identification and expression analysis of GARP family members were conducted. The results indicated that a total of 34 GARP proteins were identified in transcriptome data, all the GARP proteins were hydrophilic, 68% of which were acidic proteins, and 94% were unstable proteins. Based on the phylogenetic analysis, *Lilium* GARPs were clustered into five subfamilies: ARR-B, GLK, NIGT1/HRS1/HHO, PHR1/PHL1, and KAN, and they were annotated with functions on growth and development, biological clock regulation, flowering transformation, hormone transport, abiotic stress and other processes. The ARR-B subfamily members that played important roles in bulb development were analyzed by qRT-PCR, and the results showed that

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 山西省基础研究计划自然科学研究面上项目(20210302123416); 山西农业大学 2023 年“特优”农业科技支撑工程(TYGC23-64); 山西农业大学横向科技项目(2023HX292)

作者简介: 刘佳鑫, 在读硕士, 研究方向: 园艺植物种质创新与利用, E-mail: ljx991010@163.com

通信作者: 杜方, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事观赏植物种质创新与应用研究, E-mail: df730227@yeah.net

LhGARP33, *LhGARP30*, and *LhGARP3* may play important roles in bulb development. The *LhGARP3* and *LhGARP30* were successfully cloned and their amino acid sequences exhibited the typical ARR-Bs phosphate receptor domain (REC) and metal and phosphorylation binding sites. Spatial expression patterns of ARR-B I subgroup in flowers, leaves, and bulbs were analyzed and the results revealed that *LhGARP5* had the highest expression in leaves, while *LhGARP31* had the highest expression in flowers, *LhGARP33*, *LhGARP30* and *LhGARP3* had the basically consistent expression characteristics, the highest expression in bulbs, indicating that they may play a major role in bulb development as a key gene.

Keywords: *Lilium*; GARP family; bulb development; real time fluorescence quantitative PCR; gene cloning

GARP (Golden2、ARR-B、Psr1) 是植物特有的转录因子 (Transcription factors, TFs) 家族, 在植物中发挥多样化的作用, 如参与植物叶绿体发育、根和芽的发育、昼夜节律调控、开花转换、营养感测、激素运输和信号转导等多个途径^[1-2]。B-motif 是 GARP TFs 的特征基序, 约由 60 个氨基酸构成, 负责核定位和 DNA 结合^[1-3]。在拟南芥中, 已鉴定出 56 个 GARP TFs, 根据其主要功能被分为 5 个亚家族: ARR-B、GLK、NIGT1/HRS1/HHO、KAN 和 PHR1/PHL1^[1-2]。ARR-B TFs 主要参与调控植物根、茎组织的分化, 作为细胞分裂素正向调控因子冗余地参与植物的生长发育^[4-5]。在拟南芥中, ARR-Bs 共有 11 个成员, 被分为 3 个亚组。I 亚组包括 ARR1/2/10/11/12/14/18 共 7 个成员, II 亚组和 III 亚组则分别由 ARR13/ARR21 和 ARR19/ARR20 组成^[6], I 亚组被广泛认为负责 DNA 结合, 并在磷酸化调节途径中发挥关键作用^[4,7]。GLK TFs 在生物和非生物胁迫中发挥重要作用, 如盐胁迫、干旱、病原体侵染^[8], 并在不同物种中参与调控叶绿体的发育^[9]。AtGLK1 调控病害防御相关基因的表达^[10], GLK 突变体植株产生白化叶片表型^[9]。NIGT1/HRS1/HHO TFs 参与调控植物氮、磷的吸收和利用, 在植物生长发育和非生物胁迫中起着重要作用^[11]。KAN TFs 在叶原基的远轴面和维管组织中的韧皮部表达, 调控叶远轴面极性维持和近轴极性的抑制, 在拟南芥中以功能冗余的方式参与功能调控^[12-13]。PHR1/PHL1 TFs 主要参与植物磷饥饿响应途径^[14], 其中 PHR1 被认为是低磷信号通路中的核心转录因子^[15]。

百合 (*Lilium* spp.) 是百合科百合属多年生球根花卉, 具有很高的观赏价值和经济价值。本研究选用的材料是索邦百合, 作为著名的切花品种, 在全国范围内广泛应用^[16]。随着测序技术的发展, 越来越多的转录因子家族在百合中被鉴定, 但 GARP 家族的研究很少, 仅有 ARR-Bs I 亚家族 (ARR-Bs) 的 5 个基因: *L1RR1*、*L1RR2*、*L1RR10*、

L1RR11 和 *L1RR12* 在卷丹 (*L. lancifolium*) 中进行了功能研究, 以功能冗余的方式参与卷丹珠芽的形成, *L1ARR1/2/12* 在外源细胞分裂素 6-BA 处理下被激活表达^[17]。在亚洲百合 Matrix 中, *L1RR1* 在细胞分裂素介导的小鳞片形成中不发挥主要效应^[18], 表明不同百合中 ARR-Bs 作用的机理不同。鉴于 GARP 在植物中广泛且多样的功能, 且鳞片是百合进行无性繁殖的重要器官, 对百合 GARP 家族的系统分析和对 ARR-Bs I 亚家族进行克隆是非常必要的。

本研究基于百合二代、三代转录组数据库, 挖掘百合 GARP 转录因子家族, 进行理化性质分析和分类, 分析 GARP 基因在不同组织中的差异表达情况, 对 ARR-Bs I 亚家族中参与鳞片特异表达基因进行克隆, 分析其序列特征, 以期为深入探讨百合 GARP 基因的功能提供理论依据, 并为探索百合 Sorbonne 鳞片生长发育机制奠定一定基础。

1 材料和方法

1.1 数据来源

二代转录组数据 (NGS) 源于山西农业大学杜方课题组之前的 L.-Unigene-All 数据库^[19], 由东方百合 Sorbonne 花、叶、鳞、茎皮、根和柱头等 6 个器官的混合测序数据^[19]、麝香百合 White Europe 花粉转录组数据^[20]和 4 个基因型百合 (Star Gazer、White Fox、Connecticut King、Trumpet) 叶片转录组数据^[21]杂交组装获得。三代转录组数据 (TGS) 由 LI 等^[22]提供, 包括分别用低浓度和高浓度 IAA 处理的 7 个组织 (植株顶端、上茎、下茎、叶、支柱根、根和鳞片) 的转录组数据。拟南芥 GARP 蛋白序列 (ARR-B 和 G2-like) 下载于 PlantTF 数据库 (<http://plantfdb.gao-lab.org/index.php>)。

1.2 材料来源

以种于实验室样盆里的东方百合 Sorbonne 为试验材料, 取盛花期的内外花被片、托叶和内鳞片

分别作为样本,采样后迅速置于液氮速冻,存入-80℃冰箱保存。

1.3 百合 GARP 转录因子家族的鉴定

对 PlantTFDB 下载的 85 个拟南芥蛋白序列进行 B-motif 结构域重新鉴定,剔除不含完整 B-motif 保守位点(单个色氨酸残基 W 和 SHLQ (K/M)(Y/F))的序列。之后基于重新鉴定的 AtGARPs 对百合 NGS 和 TGS 数据库进行 BLASTP 分析(设置 $E < 1e-5$,其余参数默认),初步鉴定百合中的 GARP 同源基因。对鉴定出的百合 GARP 家族进行 B-motif 保守位点确认,去除不含完整 B-motif 结构域的序列,并将鉴定结果提交至 TBtools (v.1.120)的 Blast Zone 工具去冗余,保留最长的序列。取 NGS 和 TGS 数据库鉴定结果的并集,命名为 LhGARPs。

1.4 百合 GARP 转录因子家族的理化特征

利用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)对 LhGARPs 进行理化性质分析:氨基酸数量、蛋白分子量、等电点及总平均亲水性;利用 CELLO(v.2.5)(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)在线版本进行亚细胞定位预测。

1.5 百合 GARP 系统发育分析

利用 LhGARPs、AtGARPs 蛋白序列构建系统发育树。使用 Mega 7.0 的 Clustalw(参数默认)工具对 LhGARPs、AtGARPs 和葡萄 GARP 蛋白序列进行多序列比对。基于比对结果在 Mega 7.0 中使用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树,参数选择 P-distance、pairwise deletion, Bootstrap method 为 1 000,其他参数选择默认值。使用 TVBOT 在线工具(<https://www.chiplot.online/tvbot.html>)对系统发育树进行可视化与美化^[23]。

1.6 实时荧光定量 PCR

使用 Bio-RAD 的 Taq SYBR[®] Green qPCR Premix(Universal)试剂,选取 *Actin* 为内参基因,以基因在 Sorbonne 花瓣中的表达量为对照进行 qRT-PCR(表 1)。qRT-PCR 反应体系 20 μ L,包括: Taq SYBR[®] Green qPCR Premix 10 μ L,正、反向引物各 0.4 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 7.6 μ L。扩增条件为:95℃ 30 s;94℃ 10 s,55℃ 10 s,72℃ 30 s,循环数 40。利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算相对表达量,用 Origin 2021 绘图。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers used for quantitative RT-PCR

名称 Name	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	长度/bp Length
<i>LhGARP5</i>	CCTGATGTTGTGGTACGCT	CGTCGAGGGACTAACAAGAG	89
<i>LhGARP31</i>	AAAGAAACAGCCCTACCCG	GTCCCACATGAATACCGCTT	178
<i>LhGARP33</i>	CAAGCAGATTTTCAGGCACG	TTGTGTTCGGGATTTGGAGG	211
<i>LhGARP30</i>	ACGGGAAACAAGTAGGGT	CCTGTCATCAAAATCGCCAG	147
<i>LhGARP3</i>	CCTGTCATCAAAATCGCCAG	TACGATGGAACAGCACCTTG	169
<i>Actin</i>	TGGTGTTCATGGTTGGGATGG	GTTGAGTGGGGCTTCTGTGA	211

1.7 ARR-B I 的克隆与空间表达特征

使用卷丹 ARR-Bs 引物(LIARR1/2/10/11/12)^[24]在 Sorbonne 花、叶和鳞中均未扩增出目的条带,以 L.-Unigene-All 数据库序列为模板重新设计引物(LhGARP5/31/30/33/3)和内参 *Actin* 引物,交由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 2)。以东方百合 Sorbonne 花、叶和鳞 cDNA 为模板进行克隆。PCR 反应体系为 10 μ L,包括 cDNA 2 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,2 \times Taq PCR Master Mix 3 μ L(诺唯赞生物科技股份有限公司),ddH₂O 4 μ L。反应程序为:95℃预变性

3 min;35 个循环的变性(95℃,15 s)、退火(58℃,15 s)和延伸(72℃,1 min)过程;最后在 72℃延伸 5 min。取 8 μ L PCR 产物和 5 μ L Marker,在 1% 琼脂糖凝胶上进行检测。

使用凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段,连接至 pMD[™]19-T 载体上,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)Trans5 α ,涂入蓝白斑筛选的平板上,挑取单克隆白斑进行菌液 PCR 验证后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。利用 NCBI ORF 工具确定测序结果的 CDS 序列。

表 2 引物信息

Tab.2 Information of the primers

名称 Name	正向引物(5'—3')	Forward primer(5'—3')	反向引物(5'—3')	Reverse primer(5'—3')	长度/bp Length	来源 Origin
<i>LIARR1</i>	ATACTCAATCCCGAATGTAATGGCC	CCTGAATCAGTAACACCAAAGCTG			2 272	[24]
<i>LIARR2</i>	CAGCCGCCCTATTCTTTCTCTCTC	GGGTGTTGTACAACCTAGGATTC			2 099	[24]
<i>LIARR10</i>	ATTGGATCTTGGGGTGGATTGGTG	TCGAGCAATGCGATTGACGAACTG			1 775	[24]
<i>LIARR11</i>	TTTCTCCCCCACCATCACTTCC	AACCATTGGAGAGAGATCACG			1 791	[24]
<i>LIARR12</i>	AGAAGATGACGGTTCCTGATAGCAG	ATTAAGCCAACCTCCAAGCGACC			2 020	[24]
<i>LhGARP5</i>	TCCCGAATGTAATGGCCACC	CAACTGAATCGGGCATCCCT			2 019	GeneBank
<i>LhGARP31</i>	CTCTCTCTCTCTCTCTAGGGA	AGTCCCACATGAATACCGCT			2 469	GeneBank
<i>LhGARP33</i>	TCATCCCCTCCCAAATTGAGC	CACCATTAAAGACCCCGCAT			1 837	GeneBank
<i>LhGARP30</i>	GGGTGGATTGGTGGAGATGA	CTTGGACAGCGGACAGTTTA			1 459	GeneBank
<i>LhGARP3</i>	TCTGTCCCTGTGTCTTTCC	AGCCTACCCACTACTCAAACCT			2 197	GeneBank
<i>Actin</i>	TGCTGGATTCTGGTGATGGT	ATAGGTGGTCTCGTGGATGC			383	GeneBank

2 结果与分析

2.1 百合 GARP 转录因子家族的鉴定及其理化特征

对 86 个 AtGARPs 进行重新确认,剔除不含完整 B-motif 保守位点(单个色氨酸残基 W 和 SHLQ (K/M)(Y/F))的序列,鉴定出 61 个含完整 B-motif 保守位点的 AtGARPs。基于重新鉴定出的拟南芥 GARP 序列 Blast 检索 NGS 和 TGS 数据,去除

不完整序列和冗余序列后,最终在 NGS 鉴定出 25 个 GARP 成员, TGS 鉴定出 27 个 GARP 成员。NGS 和 TGS 中有 18 个序列同源性达 94%~100%,其中 NGS 中的 7 个序列和 TGS 中的 9 个序列匹配不到任何的同源序列。取 2 个数据库的并集,34 个 GARP 基因被命名为 *LhGARP1*~*LhGARP34*。*LhGARPs* 的鉴定及蛋白理化性质如图 1 所示。

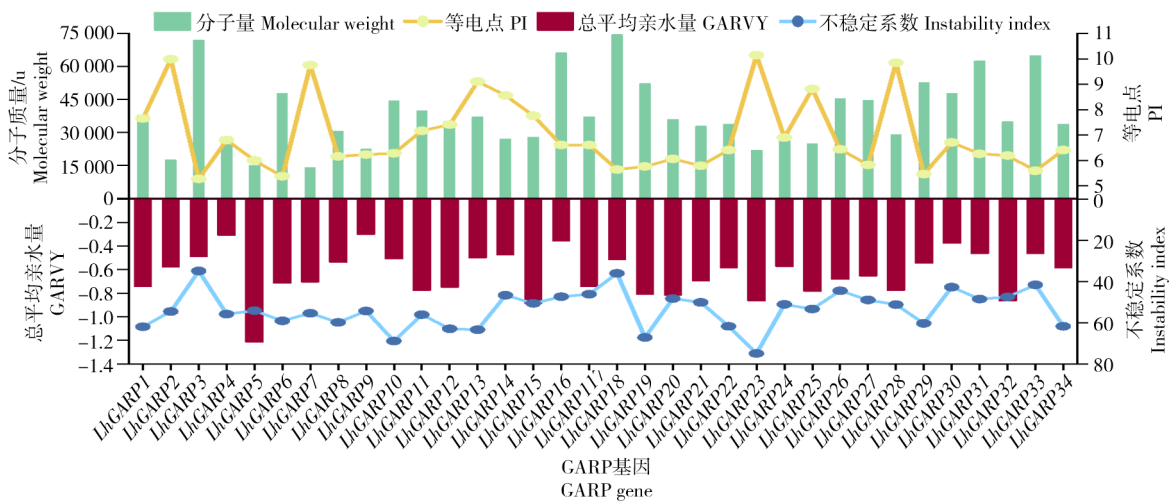


图 1 *LhGARPs* 的鉴定及蛋白理化性质

Fig.1 Identification and physicochemical property of *LhGARPs*

从图 1 可以看出, *LhGARPs* 编码 125~676 个氨基酸,分子质量在 13 878.75~74 472.78 u。理论等电点在 5.27~10.15, *LhGARPs* 蛋白 pI 值 >7 的有 11 个(32%),为碱性蛋白;其余 23 个(68%) *LhGARPs* 的 pI 值 <7,为酸性蛋白。所有蛋白的总平均亲水性(GRAVY)均 <0,表明百合 GARP 都是亲水性蛋白。不稳定指数(II)分析表明,除

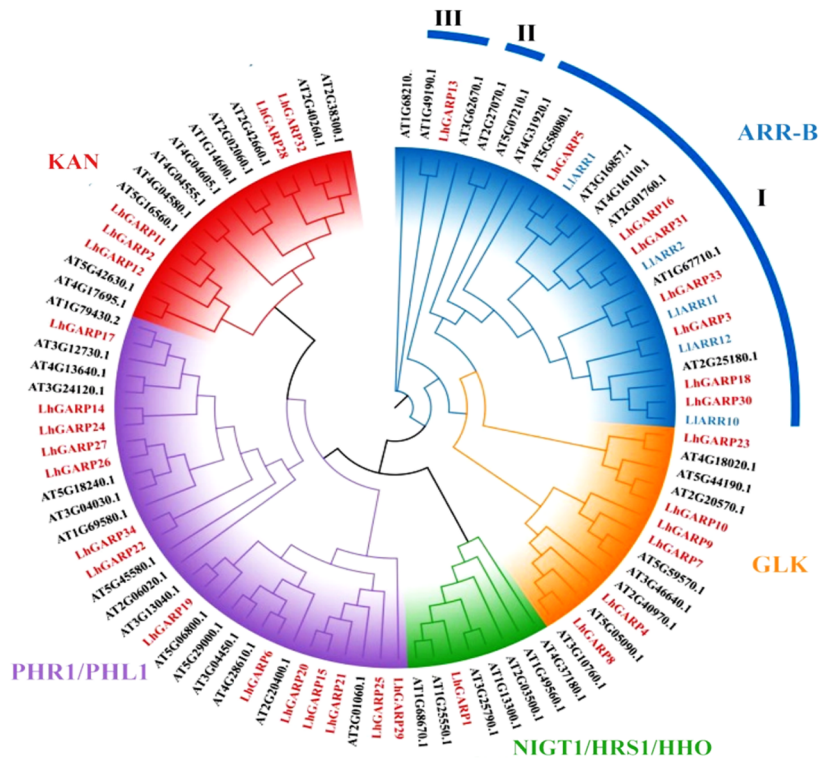
LhGARP18 和 *LhGARP3* 为稳定蛋白 (II <40) 外,其余 *LhGARPs* 均为不稳定蛋白(94%)。

2.2 GARP 系统发育树分析

为了分析百合 GARP 家族的分类及进化关系,构建并分析了百合与拟南芥 GARP 系统发育树,结果显示(图 2),GARPs 主要聚成 5 个分支,即 ARR-B, GLK, NIGT1/HRS1/HHO, PHR1/PHL1

和KAN。其中,PHR1/PHL1s成员最多,有14个; NIGT1/HRS1/HHOs和APRR成员最少,均仅包

含1个;ARR-Bs有8个成员,GLKs和KANs均含有5个成员。



红色字体标注的是LhGARPs,蓝色字体标注的是已报道的百合GARPs

The LhGARPs were marked by red color and the reported *Lilium* GARPs were marked by blue color

图2 百合与拟南芥GARP系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of GARP proteins from *Lilium* and *Arabidopsis thaliana*

同一亚家族的成员可能具有相似的调控功能,由此结合进化树分析预测LhGARPs的功能。ARR-Bs成员LhGARP5/31/30/33/3分别与已克隆到的卷丹LIRR1/2/10/11/12同源,LhGAR18/31分别与ARR10/12进化关系密切,属于I亚组成员,可能通过细胞分裂素途径参与百合鳞片的生长发育,并调控ARR-A型蛋白的表达;LhGARP13与AtRR19同源,属于III亚组,未鉴定出III亚组成员。

GLK亚家族中,LhGARP10与AtGLK1同源,可能参与调控叶绿体发育、病毒侵染、干旱胁迫等多个途径;LhGARP4/8和LhGARP7/9分别与AtBOA和AtLUX同源,可能参与生物钟信号转导途径。NIGT1/HRS1/HHOs亚家族成员LhGARP1与AtHHO3同源,可能作为转录抑制因子参与磷获取和磷饥饿信号响应。PHR1/PHL1亚家族中,LhGARP6与AtPHR1同源,可能参与低磷响应途径;LhGARP17和LhGARP14/24分别与AtAPL1和AtPHL2同源,可能参与韧皮部发育途径;Lh-

GARP19与AtMYB2同源,可能抑制茎和花药次生细胞壁的增厚;LhGARP22/26/27/34与AtMYR1/2同源,可能调控弱光下开花时间;LhGARP15/20/21/25/29与AtPHL7同源,可能在DNA结合中发挥重要作用。KAN亚家族中,LhGARP3/11/12与AtKAN1同源,可能作为远轴面极性基因参与植物远轴面极性的维持及近轴面极性特征的抑制;LhGARP32与AtMYS2同源,可能调控叶蜡的生物合成,增强植物抗寒性。

2.3 ARR-B I的空间表达特征与克隆

在系统发育树的分析中,ARR-B I亚组成员LhGARP5/31/30/33/3分别与卷丹LIRR1/2/10/11/12同源,在卷丹中冗余地调控珠芽的形成,为了研究ARR-B I亚组成员在Sorbonne中的功能,对其进行了qRT-PCR分析,结果表明(图3),LhGARP5、LhGARP31、LhGARP33、LhGARP30和LhGARP3在花、叶和鳞中均有所表达,表达水平存在差异。

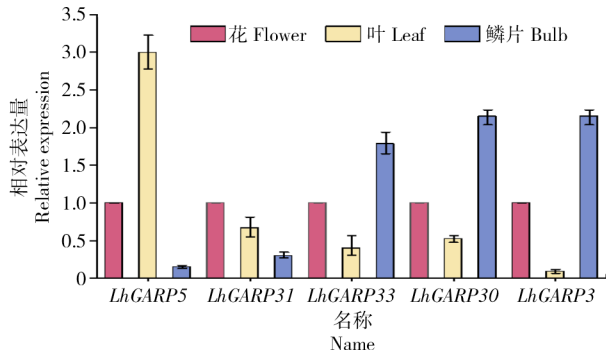


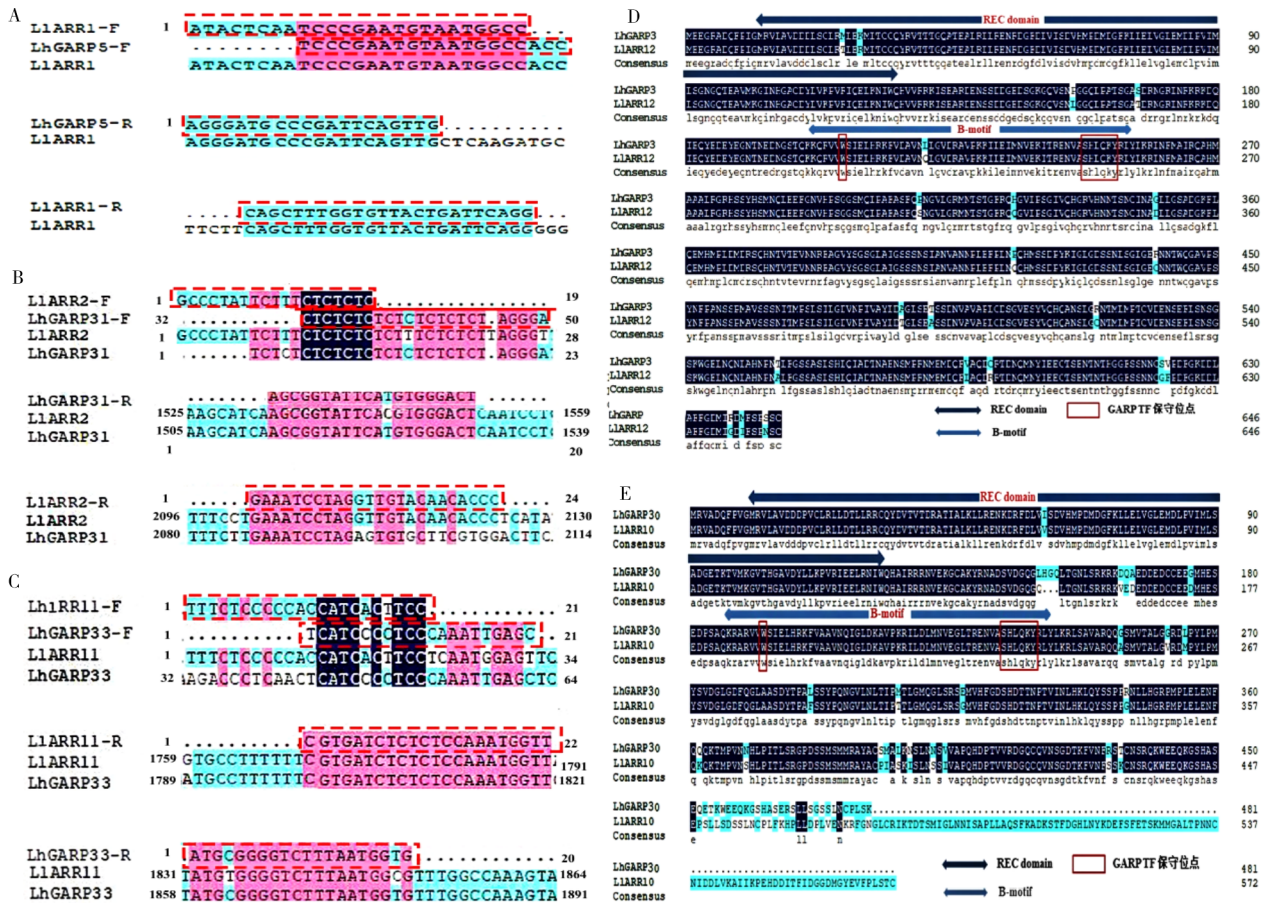
图3 ARR-BI在索邦中的表达特征

Fig.3 The expression characteristics of ARR-BI genes in Sorbonne

其中, *LhGARP33*、*LhGARP30* 和 *LhGARP3* 的表达特征基本一致, 表达水平大小为鳞片>花>叶。*LhGARP5* 的表达水平大小为叶>花>鳞片, *LhGARP31* 的表达水平大小为花>叶>鳞片。推

测在 Sorbonne 中, *LhGARP33*、*LhGARP30* 和 *LhGARP3* 可能对鳞茎发育起重要作用, *LhGARP5* 可能参与叶片的发育, *LhGARP31* 可能在花中发挥主要作用。

为了解 Sorbonne 鳞片相关基因的序列特征, 对 *LhGARP5/31/30/33/3* 进行克隆。使用卷丹引物(LIRR1/2/10/11/12-F/R, 表 2), 在 Sorbonne 中未扩增到 *LhGARP5/31/30/33/3*。将卷丹基因 *LIRR1/2/11* 与 Sorbonne 转录组数据库中的 *LhGARP5/31/33* 进行序列比对发现, 卷丹的引物与 Sorbonne 转录组相应序列不完全匹配(图 4-A、B、C)。重新设计引物后, 在 Sorbonne 中依然没有扩增出 *LhGARP5/31/33*(表 2), 更改模板浓度或使用 1 次 PCR 的产物为模板进行 2 次 PCR, 依然没有获得 PCR 产物, 最终只有 *LhGARP30* 和 *LhGARP3* 成功扩增出目的条带。



A. *LIRR1* 与 *LhGARP5* 引物序列比对; B. *LIRR2* 与 *LhGARP31* 引物序列比对; C. *LIRR11* 与 *LhGARP33* 引物序列比对; D. ARR-Bs 在不同器官的表达; E. ARR-Bs 的组织表达谱

A. *LIRR1* and *LhGARP5* primer sequence alignment; B. *LIRR5* and *LhGARP31* primer sequence alignment; C. *LIRR11* and *LhGARP33* primer sequence alignment; D. Expression of ARR-Bs in different organs; E. Tissue expression profile of ARR-Bs

图4 ARR-BI的克隆与空间表达
Fig.4 Cloning and spatial expression of ARR-B I

最终获得长 2 197 bp 的 *LhGARP3* 序列,包括 1 941 bp 的 CDS 区,编码 646 个氨基酸,与 *LIARR12* 相似性为 96.75%,存在 21 个 SAP(单氨基酸多态性)位点(图 4-D)。*LhGARP30* 序列长 1 459 bp,包括 1 443 bp 的 CDS 区,编码 481 个氨基酸,与 *LIARR10* 相似性为 74.31%,存在 1 个小片段的插入和多个 SAP 位点(图 4-E)。序列分析发现,*LhGARP3* 和 *LhGARP30* 含有 ARR-Bs 的 2 个典型结构:磷酸受体结构域(REC domain)和 B-motif 结构域,REC 结构域中存在金属位点(天冬氨酸 D)、磷酸化结合位点(丝氨酸 S)和 YXXK 功能域。

3 结论与讨论

GARP 转录因子家族在植物的多种生理过程和非生物胁迫中发挥重要作用,已在拟南芥、玉米、番茄、黄瓜等多种植物中被研究。本研究共鉴定了 34 个 GARP 转录因子,与油菜(n=146)^[25]、茶树(n=69)^[26]和紫萍(n=35)^[3]等物种的 GARP 数量不同,这说明不同物种的转录因子家族成员数量存在差异。且本研究虽基于二代、三代转录组数据尽可能挖掘百合 GARP 转录因子,但百合全基因组库的缺少,仍限制了 GARP 转录因子的挖掘,这也可能是百合 GARP 数量较少的原因。所鉴定的百合 GARP 多为酸性蛋白、不稳定蛋白,均为亲水蛋白,与茶树^[26]和 大豆^[27]GARP 家族的蛋白理化性质相似。亚细胞定位预测表明,有 2 个 GARP 转录因子定位于叶绿体,3 个定位于细胞质,其他 29 个均定位于细胞核,可见 GARP 家族执行功能的位置具有多样性。

GARP 一般可分为 5 个亚家族:ARR-B、GLK、KAN、NIGT1/HRS1/HHO 和 PHR1/PHL1,百合也是如此(图 2)。亚家族数量分布 KANs、ARR-Bs 和 PHR1/PHL1s 多于 NIGT1/HRS1/HHOs 和 GLKs,与茶树^[26]、大豆^[27]和紫萍^[3]等亚家族数量分布规律一致。进化结果预测了 34 个百合 GARP 的功能,可能参与鳞片生长发育、生物钟调节、磷饥饿信号响应、硝酸盐转运途径、韧皮部发育、光影响的开花时间、叶极性形成等多个过程。

基因的表达模式是预测基因功能的重要依据之一,组织差异表达暗示基因可能发挥调控作用的部位^[28-29]。卷丹是亚洲百合的亲本之一,而 Sorbonne 属于东方百合。在 Sorbonne 中,*LhGARP5* 在叶中高表达,在花中次之,在鳞片中低表达,与卷丹同源基因 *LIRR1* 在叶高表达,在花和鳞片中低

表达的结果一致。*LhGARP31* 在花中表达量较高,在叶和鳞片中低表达,与卷丹同源基因 *LIRR2* 在叶高表达,在花和鳞片中低表达的结果不一致。在 Sorbonne 中,*LhGARP33/30/3* 在鳞片中表达量最高,在花中次之,在叶中低表达。在卷丹中,*LhGARP33* 同源卷丹基因 *LIRR11* 在花药高表达,在花、叶和鳞片中均低表达,*LhGARP30* 同源基因 *LIARR10* 在营养器官中均高表达(根>茎>幼叶>鳞片)^[26]和 *LhGARP3* 同源基因 *LIARR12* 在鳞片中表达量最高,在叶和花中表达量较低^[26],与本研究结果一致。百合 Sorbonne 和卷丹同源基因表达水平的差异可能是由基因型不同所致,在 Sorbonne 鳞片发育中,*LhGARP33/30/3* 可能发挥重要作用。

ARR-Bs 在细胞分裂素介导的植物根系生长和发育中发挥重要作用^[4-5],其中 ARR-B I 成员在卷丹中参与珠芽的形成^[26]。本研究在 Sorbonne 中鉴定到了 5 个 ARR-B I 组成员 *LhGARP5/31/30/33/3*,分别与卷丹 *LIRR1/2/10/11/12* 同源,对 *LhGARP5/31/30/33/3* 进行克隆,最终只有 *LhGARP3* 和 *LhGARP30* 成功克隆。*LhGARP3* 和 *LhGARP30* 氨基酸序列具有 ARR-Bs 典型的 REC domain 及金属和磷酸化结合位点。*LhGARP3* 和 *LhGARP30* 与卷丹同源蛋白存在 SAP 位点的差异,说明不同百合 ARR-B 基因的序列存在差异,可能使 ARR-Bs 在百合中发挥不同功能。

综上所述,本研究首次在百合中对转录因子家族进行了系统研究,共鉴定了 34 个百合 GARP 转录因子,分为 5 个亚家族。通过与拟南芥 GARP 的比较分析,预测百合 GARP 可能参与生长发育、生物钟调节、开花转化、激素运输、非生物胁迫等多个途径。ARR-B I 成员 *LhGARP33*、*LhGARP30* 和 *LhGARP3* 可能作为关键基因在 Sorbonne 鳞片发育过程中发挥主要作用。本研究结果为全面了解百合 GARP 转录因子提供了基础资料,为探索 Sorbonne 百合鳞片生长发育机制奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] SAFI A, MEDICI A, SZPONARSKI W, et al. The world according to GARP transcription factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 39: 159-167.
- [2] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. *Science*, 2000, 290: 2105-2110.
- [3] ZHAO X Y, YANG J J, LI X Z, et al. Identification and expression analysis of GARP superfamily genes in response to nitrogen and phosphorus stress in *Spirodela polyrrhiza*[J]. *BMC*

- Plant Biology, 2022, 22(1):308.
- [4] 吴臻一, 阮高晨, 周晋吉, 等. B 类 RRs 转录因子研究现状[J/OL]. 分子植物育种, 2025: 1-8. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230707.0930.006.html>.
WU Z Y, RUAN G C, ZHOU J J, et al. Research status of class B RR transcription factors[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2025: 1-8. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230707.0930.006.html>.
- [5] KUREPA J, LI Y, SMALLE J A. Cytokinin signaling stabilizes the response activator ARR1[J]. The Plant Journal, 2014, 78(1):157-168.
- [6] BHARGAVA A, CLABAUGH I, TO J P, et al. Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2013, 162(1):272-294.
- [7] YOKOYAMA A, YAMASHINO T, AMANO Y I, et al. Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant & Cell Physiology, 2007, 48(1):84-96.
- [8] 刘俊芳, 张佳, 李贺, 等. 植物 GOLDEN2-Like 转录因子研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10):3949-3956.
LIU J F, ZHANG J, LI H, et al. Research progress of plant GOLDEN2-like transcription factor[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(10):3949-3956.
- [9] FITTER D W, MARTIN D J, COPLEY M J, et al. GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species[J]. Plant Journal, 2002, 31(6):713-727.
- [10] CHEN M, JI M L, WEN B B, et al. GOLDEN 2-LIKE transcription factors of plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1509.
- [11] LI Q, ZHOU L Y, LI Y H, et al. Plant NIGT1/HRS1/HHO transcription factors: key regulators with multiple roles in plant growth, development, and stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16):8685.
- [12] 郑奔, 周冰莹, 吴刚, 等. 植物叶片近-远轴极性建成研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(12):2091-2100.
ZHENG B, ZHOU B Y, WU G, et al. Advance in the study of leaf adaxial-abaxial polarity development in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(12):2091-2100.
- [13] KERSTETTER R A, BOLLMAN K, TAYLOR R A, et al. KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*[J]. Nature, 2001, 411:706-709.
- [14] WANG Z, ZHENG Z, ZHU Y M, et al. PHOSPHATE RESPONSE 1 family members act distinctly to regulate transcriptional responses to phosphate starvation[J]. Plant Physiology, 2023, 191(2):1324-1343.
- [15] BUSTOS R, CASTRILLO G, LINHARES F, et al. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genetics, 2010, 6(9):e1001102.
- [16] 刘芝芝, 樊俊苗, 王银柱, 等. 百合 Sorbonne 和 Red Life 香气差异及其单萜合成酶结构分析[J]. 山西农业科学, 2021, 49(5):566-571.
LIU Z Z, FAN J M, WANG Y Z, et al. Analysis of Aroma Differences and Monoterpene Synthase Structures between Sorbonne and Red Life of Lily[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(5):566-571.
- [17] MO J L, QU Y X, HE G R, et al. Effect of exogenous 6-BA induced *Lilium lancifolium* bulblets formation in aerial cultivation[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 309:111644.
- [18] LIANG J H, CHEN Y Z, HOU J Q, et al. Cytokinins influence bulblet formation by modulating sugar metabolism and endogenous hormones in Asiatic hybrid lily[J]. Ornamental Plant Research, 2023, 3(1):3-9.
- [19] DU F, WU Y, ZHANG L, et al. De novo assembled transcriptome analysis and SSR marker development of a mixture of six tissues from *Lilium* oriental hybrid 'sorbonne'[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(2):281-293.
- [20] OBERMEYER G, FRAGNER L, LANG V, et al. Dynamic adaptation of metabolic pathways during germination and growth of lily pollen tubes after inhibition of the electron transport chain[J]. Plant Physiology, 2013, 162(4):1822-1833.
- [21] SHAHIN A, VAN KAAUWEN M, ESSELINK D, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags in the extreme large genomes *Lilium* and *Tulipa*[J]. BMC Genomics, 2012, 13:640.
- [22] LI J R, SUN M Y, LI H, et al. Full-length transcriptome-referenced analysis reveals crucial roles of hormone and wounding during induction of aerial bulbils in lily[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1):415.
- [23] XIE J M, CHEN Y R, CAI G J, et al. Tree Visualization By One Table(tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(W1):587-592.
- [24] HE G R, YANG P P, CAO Y W, et al. Cytokinin type-B response regulators promote bulbil initiation in *Lilium lancifolium*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7):3320.
- [25] HUA Y P, WU P J, ZHANG T Y, et al. Genome-scale investigation of *GARP* family genes reveals their pivotal roles in nutrient stress resistance in allotetraploid rapeseed[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(22):14484.
- [26] YUE C, CHEN Q Q, HU J, et al. Genome-wide identification and characterization of *GARP* transcription factor gene family members reveal their diverse functions in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13:947072.
- [27] SINGH R, PANDEY A, VERMA P K. Comparative genomic analysis of *GARP* transcription factor family in legumes and identification of stress-responsive candidate genes[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(10):6005-6020.
- [28] 孙福辉, 方慧仪, 温小蕙, 等. 马银花 *MADS*-box 基因家族系统进化与表达分析[J]. 植物学报, 2023, 58(3):404-416.
SUN F H, FANG H Y, WEN X H, et al. Phylogenetic and expression analysis of *MADS*-box gene family in *Rhododendron ovatum*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2023, 58(3):404-416.
- [29] 吴鹏, 李冬雪, 郭茜茜. 辣椒 *EIL* 基因家族的鉴定及其在盐碱胁迫下的表达分析[J]. 河南农业科学, 2024, 53(5):123-132.
WU P, LI D X, GUO Q Q. Identification and expression analysis of *eil* family under saline alkali stress in *Capsicum annum* L.[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2024, 53(5):123-132.