



石蒜同源基因沉默体系构建及鳞茎发生基因功能验证

肖潇¹, 夏宜平¹, 崔柳², 张佳平¹, 洪震³, 任梓铭^{2*}

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 观赏植物基因组与基因工程实验室, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江理工大学建筑工程学院风景园林系, 浙江 杭州 310018; 3. 华东药用植物园科研管理中心, 浙江 丽水 323000)

摘要 本研究以浙江省野生资源丰富的海滨石蒜(*Lycoris insularis*)为材料, 构建了以鳞茎为外植体的石蒜同源基因沉默体系, 并通过该体系验证了海滨石蒜鳞茎发生基因的生物功能。通过设计特异性引物, 从鳞茎中克隆获得*LiCWIN*基因片段, 全长1 706 bp; 经双酶切后与烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)载体TRV2-GFP连接, 从而构建病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)重组载体; 转化根癌农杆菌后, 用菌液侵染损伤刺激后的鳞茎块。侵染2 d后, 观察到鳞茎维管组织中存在绿色荧光; 实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorogenic quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测发现, 沉默组*LiCWIN*基因表达量显著降低。侵染40 d后, 相较于空载体对照组, *LiCWIN*基因沉默组小鳞茎发生数量下降且发育迟缓。上述结果表明, VIGS体系在海滨石蒜鳞茎组织中成功沉默了功能基因, 且对小鳞茎后期发育的表型产生了持续影响。特别是*LiCWIN*基因沉默后, 小鳞茎发生受阻。本研究为石蒜鳞茎发生发育关键基因的功能研究奠定了基础。

关键词 石蒜属; 基因功能; 瞬时验证; 病毒诱导的基因沉默; 体系构建; *CWIN*基因; 小鳞茎发生

中图分类号 S682.29

文献标志码 A

引用格式 肖潇, 夏宜平, 崔柳, 等. 石蒜同源基因沉默体系构建及鳞茎发生基因功能验证[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2025, 51(1): 89–101. DOI:10.3785/j.issn.1008-9209.2024.12.181

XIAO Xiao, XIA Yiping, CUI Liu, et al. Establishment of a homologous gene silencing system and gene function verification of bulb formation in *Lycoris* Herb. [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2025, 51(1): 89–101.

Establishment of a homologous gene silencing system and gene function verification of bulb formation in *Lycoris* Herb.

XIAO Xiao¹, XIA Yiping¹, CUI Liu², ZHANG Jiaping¹, HONG Zhen³, REN Ziming^{2*} (1. Genomics and Genetic Engineering Laboratory of Ornamental Plants, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 2. Department of Landscape Architecture, School of Civil Engineering and Architecture, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 3. Scientific Research Management Center of East China Pharmaceutical Botanical Garden, Lishui 323000, Zhejiang, China)

Abstract In this study, we explored the construction of a homologous gene silencing system for *Lycoris insularis*, which is a rich wild resource in Zhejiang Province with bulbs as explants, and through this system, the biological functions of *Lycoris insularis* bulb genes were verified. The 1 706 bp fragment of *LiCWIN* gene was cloned from

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(ZCLTGN24C1601); 浙江省农业新品种重大专项花卉育种专项(2021C02071-6); 国家自然科学基金项目(32101571)。

***通信作者** (Corresponding author): 任梓铭 (https://orcid.org/0000-0001-9130-6272), Tel: +86-571-86843052, E-mail: zimingren@zju.edu.cn

第一作者 (First author): 肖潇 (https://orcid.org/0009-0005-3619-0031), E-mail: 22216282@zju.edu.cn

收稿日期 (Received): 2024-12-18; **接受日期** (Accepted): 2025-01-26

the bulb by using specifically designed primers. After double enzyme digestion, the virus-induced gene silencing (VIGS) recombinant vector was constructed by connection with tobacco rattle virus (TRV) vector TRV2-GFP. After the transformation of *Agrobacterium tumefaciens*, the damaged and stimulated bulbs were infected with the bacterial solution. After 2 d of infection, the green fluorescence was observed in the vascular tissues of bulbs, and the expression level of *LiCWIN* gene was significantly decreased in the silenced group, as determined by real time fluorogenic quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). After 40 d of infection, compared with the empty vector control group, the number of bulblets in *LiCWIN* gene silencing group decreased, and their formation was delayed. The above results showed that VIGS system successfully silenced functional genes in the bulbous tissues of *Lycoris insularis* and had a lasting effect on the later development of bulblets. After silencing of *LiCWIN* gene, the formation of bulblets was blocked. This study can lay a foundation for the study of key gene functions of *Lycoris* bulb formation and development.

Keywords *Lycoris* Herb.; gene function; instantaneous verification; virus-induced gene silencing (VIGS); system construction; *CWIN* gene; bulblet formation

石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物作为我国球根花卉中的资源优势类群,具备耐热、耐寒、耐旱、耐瘠薄以及病虫害少等优良特性,在鲜切花、盆花及园林景观配置方面具有较高的应用价值;与此同时,其药用价值也备受关注^[1-2]。中国作为石蒜属植物的分布中心,拥有丰富的资源,但大部分石蒜属植物处于野生状态^[3]。随着园林景观应用需求的不断增长及药物研发的深入推进,石蒜属植物鳞茎的采挖量持续增加,对其资源保护构成了严重威胁。但在自然状态下,石蒜属植物鳞茎发育缓慢,营养繁殖时增殖率低,规模化生产尚未实现^[4]。因此,开展基因功能研究,揭示石蒜生长发育分子机制,是保护珍稀濒危野生石蒜属资源、扩大石蒜属植物栽培生产规模的重要手段。

基因功能研究对于揭示植物生长发育和环境适应的分子机制起着关键作用。目前,验证基因功能的技术主要包括过表达、基因敲除和沉默^[5]。构建稳定、高效的目标植物同源验证体系是深入研究植物生命活动相关基因功能的前提^[6]。由于物种间存在差异,不存在通用的同源验证体系^[7]。模式植物如拟南芥等生长周期短,能快速获取转基因实验结果。而球根花卉大多生长周期较长,如郁金香、朱顶红、石蒜等从播种到开花常需数年,这使得转基因实验周期大幅延长。因此,许多研究通过组学数据中的基因功能注释和表达模式来推测基因功能^[8-10],或借助模式植物进行异源验证^[11-13]。与同源验证的结论相比,这些研究结果的说服力相对不足,进而限制了对目标植物基因功能及其作用机制的深入探索^[14-15]。此外,球根花卉具有器官特殊性,

变态的地下部分能储存营养,适应环境变化,并通过顶芽和腋芽进行繁殖,拟南芥等模式植物的功能验证体系无法直接应用于球根花卉变态茎的发生发育研究。

传统的石蒜组织培养面临诸多困境,如愈伤组织褐化、玻璃化、污染严重、诱导增殖效率低以及移植后成活率低等,导致完整、稳定、高效的石蒜同源转基因体系难以建立。此外,组培苗移栽适应性差,致使其出瓶后成活率较低,这些问题极大地阻碍了人们对调控石蒜生长发育相关基因功能的研究。因此,对于石蒜属花卉而言,在基于高效组织培养技术的同源稳定转化体系难以构建的前提下,充分利用当前瞬时验证技术,来尝试构建可靠、高效的基因功能瞬时验证体系,有助于大大提升石蒜属花卉功能基因的研究水平。

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术因操作简便、研究周期短、无需遗传转化等优点,在众多单、双子叶植物中得到广泛应用^[16-17]。与传统基因功能分析方法相比,VIGS技术能够在侵染植物当代对目的基因进行沉默和功能分析,无需开发稳定的转化因子和进行复杂的组织培养,且具备沉默单个或多个基因家族成员的潜力^[18-19],是当前功能基因组学研究领域最具吸引力的技术之一^[20]。烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)具有寄主范围广、沉默效率高、持续时间长等优点,已成为构建 VIGS 体系中应用最广泛的病毒^[21],在多种非模式植物如草莓(*Fragaria × ananassa*)^[22]、棉花(*Gossypium* spp.)^[23]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[24]、胡杨(*Populus euphratica*)^[25]、麻风树(*Jatropha*

curcas)^[26]等中均有应用。在球根花卉如百合(*Lilium* spp.)^[27]、水仙(*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.)^[28-29]、百子莲(*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*)^[30]等中已建立 VIGS 体系,其中,以百合鳞片、花被片、带花苞和花梗的花枝与幼苗作为外植体建立的 VIGS 体系已有报道^[31-36]。对于生长周期长且具休眠特性的球根花卉石蒜的基因功能研究而言,VIGS 技术无需植株完成整个生命周期即可获取稳定转化苗,可有效提高研究效率。目前,石蒜相关基因同源沉默的研究仅在花瓣外植体中展开^[37-38],以鳞茎为侵染对象的研究尚未见报道。

海滨石蒜(*Lycoris insularis*)隶属于石蒜科(Amaryllidaceae)石蒜属,是东亚特有的多年生球根花卉,花色花型丰富,也是浙江省石蒜属优势种质资源,具有丰富的生态型和良好的本土适应性^[39]。

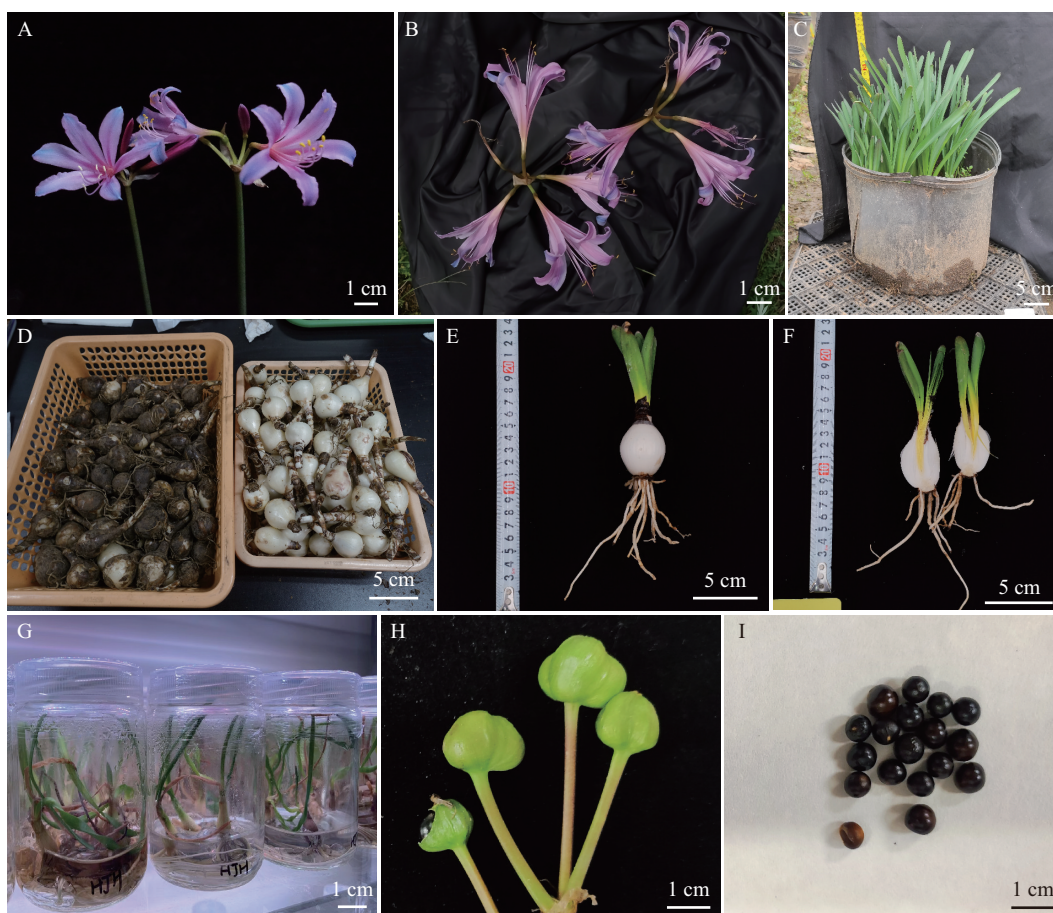
鉴于此,本研究选取海滨石蒜鳞茎为侵染对象,构建基于 VIGS 的同源瞬时沉默系统,以期为石蒜属及地下芽植物的基因功能同源性验证提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物材料为海滨石蒜(图1)鳞茎,取直径15.0~25.0 mm的鳞茎约100个,于冬末春初(12月到次年1月)即海滨石蒜无叶期开展实验。

植物表达载体为 TRV2-GFP,农杆菌菌株为 GV3101。植物总 RNA 提取试剂盒(RNA Prep Pure Plat Kit)购自天根生化科技(北京)有限公司;快速聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)混合液



A. 花序正视图;B. 辐射状花序俯视图;C. 叶期(3月);D. 鳞茎去皮前(左)与清洗去皮后(右);E. 全株;F. 鳞茎纵切,示意叶发生;G. 组培苗;H. 果实;I. 种子。

A. Front view of inflorescence; B. Top view of radiant inflorescence; C. Leaf period (March); D. Bulbs before peeling (left) and after cleaning and peeling (right); E. Whole plant; F. Bulbs are cut longitudinally to indicate foliation; G. Tissue culture seedlings; H. Fruit; I. Seed.

图1 植物(海滨石蒜)材料图

Fig. 1 Pictures of plant (*Lycoris insularis*) materials

(2×Rapid Taq Master Mix)购自南京诺唯赞生物科技有限公司; cDNA 合成试剂盒(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、定量 PCR 专用反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser)、高保真酶(PrimeSTAR® Max DNA Polymerase)、胶回收试剂盒(Mini BEST Agarose Gel Extraction Kit)和实时荧光定量 PCR(real time fluorogenic quantitative PCR, qRT-PCR)专用试剂盒(TB Green™ Premix Ex Taq™ II)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit)购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 目的基因鉴定与克隆

参照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取海滨石蒜鳞茎总 RNA,利用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计检测 RNA 样品浓度。使用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为第一链 cDNA。基于海滨石蒜转录组数据库,对海滨石蒜小鳞茎发生、糖代谢途径进行生物信息学分析,选择 *LiCWIN* 作为模板基因设计特异性引物(表 1),目标片段长度为 1 706 bp。用高保真酶扩增基因片段,PCR 体系参照说明书,扩增程序为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30~35 次;72 °C 延伸 10 min。随后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,使用凝胶成像系统(ChemiDoc,美国 Bio-Rad 公司)观察拍照并回收。

1.3 目标载体构建

将带有增强绿色荧光蛋白(enhanced green

fluorescence protein, EGFP)标记外壳片段的 TRV2-GFP 载体与 TRV2 载体相比,发现两者在侵染和基因沉默上表现出相似的效率^[40]。活化和扩繁含有 TRV2-GFP 质粒的大肠埃希菌菌种,使用质粒提取试剂盒提取质粒。本研究使用的限制性内切酶 *Xba*I 与 *Sac*I 在 37 °C 下线性化 30 min^[19],双酶切 TRV2-GFP 载体,酶切体系如下:TRV2-GFP 质粒 1~2 μg(根据质粒提取浓度计算体积),10×Q Cut Buffer 2 μL, *Xba*I 1.5 μL, *Sac*I 1.5 μL,用 ddH₂O 定容至 20 μL。于 37 °C 下控温 30 min,酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收。

重组质粒 TRV2-GFP-*LiCWIN* 体系(图 2):线性化载体 100 ng,插入片段 *LiCWIN* 10 ng,5×CEII 缓冲液 4 μL,ExnaseII 2 μL,用 ddH₂O 定容至 20 μL。于 37 °C 下控温 30 min,随后降至 4 °C 或立即置于冰上冷却 5 min。

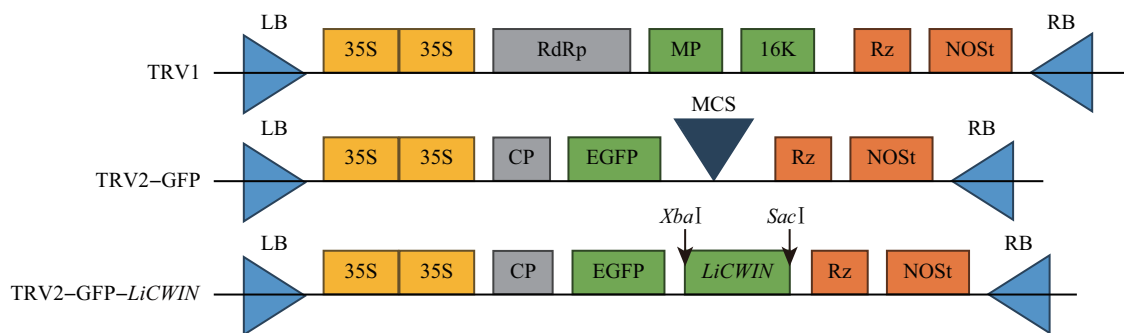
1.4 质粒转化与侵染准备

将重组连接产物加入大肠埃希菌进行转化(图 3),涂板 LB(Luria-Bertani)固体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)上,于 1~2 d 后查看是否有单菌落生成。在超净工作台中挑选菌斑,并将其接种在 LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中,于 37 °C 黑暗条件下过夜振荡培养。用 PCR 检验阳性菌落,检验体系参照快速 PCR 混合液说明书。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段大小正确后,对菌液进行测序和比对。比对正确后,提取阳性大肠埃希菌质粒。

表 1 设计用于重组 TRV 载体构建和 PCR 扩增的特异性引物

Table 1 Specific primers designed for recombinant TRV vector construction and PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	用途 Purpose
<i>LiCWIN</i> -F	ATGGAGATTTCAAATGGGGT	cDNA 全长克隆
<i>LiCWIN</i> -R	TCAATTCATCATCAAAGGCTTC	
TRV2- <i>LiCWIN</i> -F	AAGGTTACCGAATTCTCTAGAATGGAGATTTCAAATGGGGT	载体构建
TRV2- <i>LiCWIN</i> -R	GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCTCAATTCATCATCAAAGGCTTC	
q- <i>LiCWIN</i> -F	GGCCAATTGCAGAGCTTGAG	插入片段 qRT-PCR 检测
q- <i>LiCWIN</i> -R	AGTTTGCTCCTCCCTCGTTG	
q- <i>Actin</i> -F	CATCCCTCAGCACCTTCCAG	qRT-PCR 检测
q- <i>Actin</i> -R	CTGGGATGCAAAAACCGCC	
TRV1-F	AAGGTTACCGAATTCTCTAGATTACAGGTTATTTGGGCTAG	反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)检测
TRV1-R	GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCCCGGTTCAATTCCTTATC	
TRV2-F	AAGGTTACCGAATTCTCTAGATGGGAGATGATACGCTGTT	RT-PCR 检测(含插入片段)
TRV2-R	GGCCTCGAGACGCGTGAGCTCCCTAAAACTTCAGACACG	



LB:左缘;RB:右缘;35S:CaMV 35S启动子;RdRp:RNA依赖的RNA聚合酶;MP:运动蛋白;16K:16 kDa蛋白;Rz:自裂核酶;NOS: NOS终止子;CP:外壳蛋白;EGFP:增强绿色荧光蛋白;MCS:多克隆位点。

LB: Left border; RB: Right border; 35S: CaMV 35S promoter; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase; MP: Movement protein; 16K: 16 kDa protein; RZ: Self-cleaving ribozyme; NOS: NOS terminator; CP: Coat protein; EGFP: Enhanced green fluorescence protein; MCS: Multiple cloning site.

图2 TRV1、TRV2-GFP、TRV2-GFP-LiCWIN载体示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of TRV1, TRV2-GFP, and TRV2-GFP-LiCWIN vectors

依据农杆菌说明书,将阳性大肠埃希菌质粒转化GV3101感受态细胞,涂布于LB固体培养基(含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L利福平)上,于28℃下暗培养3~4 d,挑取阳性单菌落于LB液体培养基(含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L利福平)中扩繁。用PCR检验阳性菌落,检验体系同检验阳性大肠埃希菌体系。

扩繁含目标质粒的农杆菌GV3101菌液至 $D(600\text{ nm})$ 为1.0~1.5,离心后加入同体积侵染液重悬菌体,避光2~3 h。侵染液现配现用,配方为1 L侵染液中含1 mol/L MgCl_2 母液10 mL,无水2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)溶液9.76 mL,0.1 g/mL乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)溶液400 μL 。MES母液为精确称量25 g MES,加入250 mL无菌水,使用NaOH调节pH值至5.6,在超净工作台内过滤除菌(通过0.22 μm 绿色水膜过滤器过滤除菌),配制得到MES溶液并于-20℃下冻存。

1.5 植物材料预处理

流水冲洗鳞茎,去除鳞茎外皮,清水没过鳞茎基盘并浸泡过夜(或浸泡3 h以上)以恢复鳞茎活力。可依据研究目的改变对实验材料的预处理方法,如激素处理^[41]、热处理^[42]、预冷处理^[43]、盐胁迫处理^[44]等。

1.6 灭菌消毒、抽真空侵染与培养

海滨石蒜鳞茎VIGS同源瞬时系统如图4所示。将恢复活力的鳞茎冲洗干净,去除冗余根系、鳞茎褐化部分及鳞茎颈部,将鳞茎由基盘底部向上按十字切分成4块,用牙签在基盘和鳞片组织中扎数个

孔。将鳞茎块分为2组,分别浸泡在0.1%代森锰锌溶液和0.1%多菌灵溶液中30 min并用玻璃棒不断搅拌,最后用超纯水洗净并稍稍晾干。

本研究共设置6个处理组(表2),将鳞茎块完全浸没在农杆菌侵染液中,采用SHB-III A循环水式多用真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司)负压真空(-0.8 kg/cm²)抽吸20 min,缓慢放气20 min(图4G)。搪瓷盘中铺灭菌纱布,将侵染后的鳞茎块滤干摆放在纱布上,盖上2层纱布与锡纸(图4I)。放入温度24℃、相对湿度60%的人工气候箱(上海一恒科学仪器有限公司)暗培养48 h,揭开锡纸,在光照周期14 h光照/10 h黑暗、光照强度4 000 lx环境下继续培养。每天用超纯水浇湿下层纱布1次,早晚各喷湿上层纱布1次,培养第7天时喷施对应灭菌药物。

1.7 绿色荧光蛋白检测

暗培养2 d后,使用紫外灯照射鳞茎块。侵染6 d后,使用激光扫描共聚焦显微镜(FV3000,日本奥林巴斯公司)对侵染后的鳞茎块撕取鳞片外表皮进行绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)成像。用488 nm激光束激发被侵染的鳞茎块GFP信号,用510 nm激光束检测时效果最佳。

1.8 表型观察

在人工气候箱内培养4~5 d后,鳞茎内层鳞片分化出叶片,基盘处生根,此时观察鳞茎形态并统计相关指标,如叶片生长长度、鳞片膨大数、出根数等。

小鳞茎发生指标包括新产生的小鳞茎总数、小

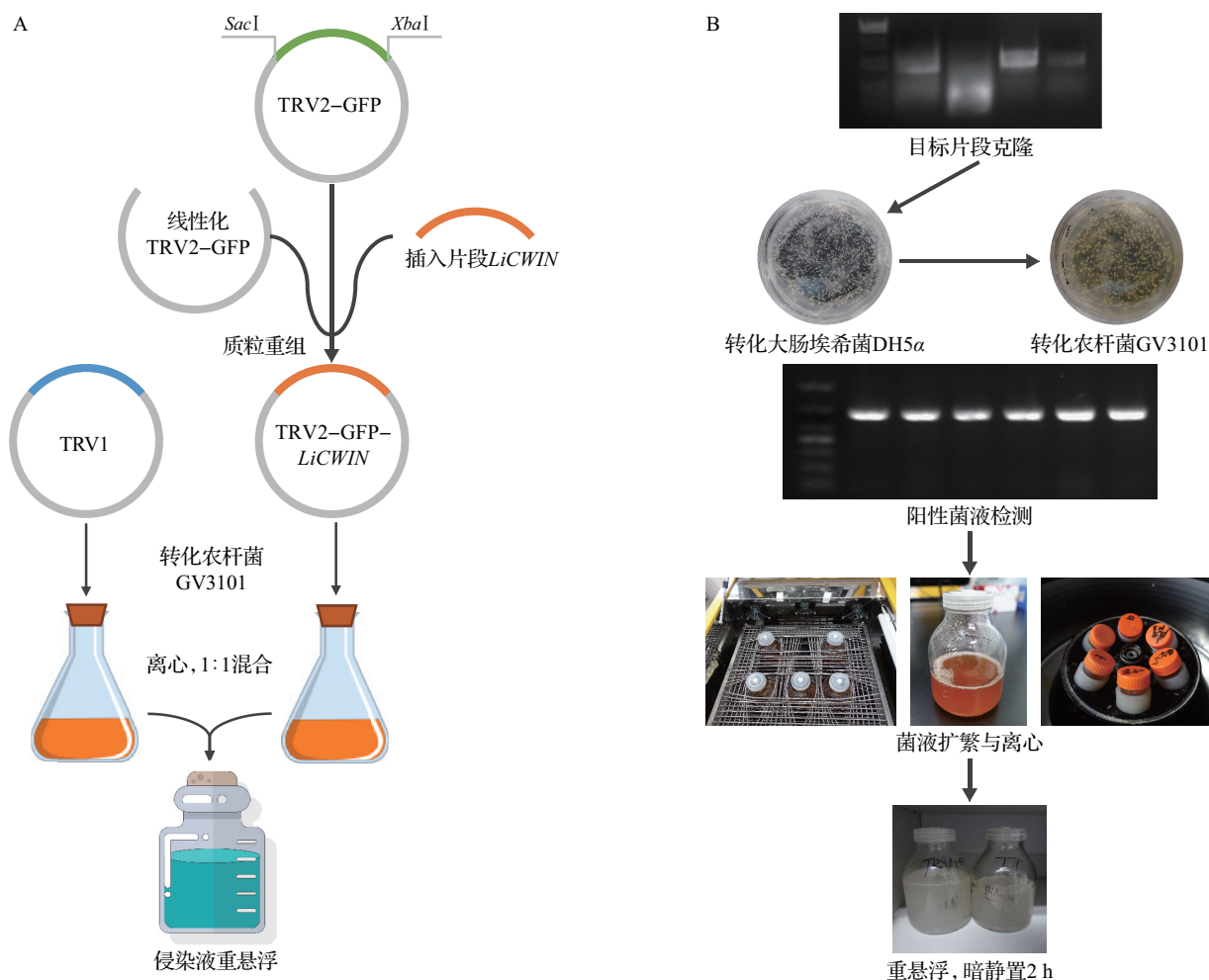


图3 TRV2-GFP-*LiCWIN*重组转化及侵染液准备示意图

Fig. 3 Schematic diagrams of recombination and transformation of TRV2-GFP-*LiCWIN* and preparation of infiltration solution

鳞茎发生位置(即小鳞茎产生的鳞片层数)等^[45],所有指标均设置3次以上生物学重复。在人工气候箱内培养15 d后,可将鳞茎块转移至基质(草炭、蛭石、珍珠岩的体积比为2:1:1)中扦插培养,以进行后续生长表型观察。

1.9 基因表达检测

在不同时间点,对每种处理选取3个以上的鳞茎块用液氮速冻。由于本研究探究基因对小鳞茎发生的影响,故切除远离基盘的部分鳞片,并去除因实验操作损伤较为严重的最外层2~3层鳞片。使用植物总RNA提取试剂盒提取处理组与对照组海滨石蒜鳞茎总RNA,反转录成cDNA并用特异性引物扩增,使用RT-PCR检测TRV2-GFP-*LiCWIN*和TRV1(表1),使用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

利用设计的特异性引物,以来自海滨石蒜的*Actin*基因作为内参(表1),确定目的基因*LiCWIN*与其他相关基因的表达水平。参照TB Green™ Premix

Ex Taq™ II体系进行qRT-PCR检测。采用CFX96实时荧光检测系统(美国Bio-Rad公司)分析沉默鳞茎与对照鳞茎中基因相对表达量,数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析并计算,重复3次^[38]。

2 结果与分析

2.1 TRV2-GFP-*LiCWIN*载体构建与鉴定

采用PCR克隆*LiCWIN*片段,产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,目标条带长度约为1 700 bp,大小符合预期。转化大肠埃希菌DH5 α 细胞,在LB固体培养基(含50 mg/L卡那霉素)上可清晰地观察到单菌落。检验阳性大肠埃希菌,通过序列比对确认插入载体的目标核苷酸序列。提取质粒并将含目标片段的质粒转化到农杆菌GV3101中,培养3~4 d后,在LB固体培养基(含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L利福平)上可清晰地观察到单菌落,表明载体构建



图 4 海滨石蒜鳞茎 VIGS 同源瞬时系统示意图

Fig. 4 Schematic diagram of VIGS homologous transient system in *Lycoris insularis* bulbs

表 2 农杆菌侵染实验处理组

Table 2 Treatment groups for agrobacterium infection experiments

编号 No.	处理组 Treatment group	消毒方式 Disinfection method
1	农杆菌 TRV2-GFP- <i>LiCWIN</i> +TRV1	0.1%代森锰锌溶液
2	农杆菌 TRV2-GFP- <i>LiCWIN</i> +TRV1	0.1%多菌灵溶液
3	农杆菌 TRV2-GFP+TRV1	0.1%代森锰锌溶液
4	农杆菌 TRV2-GFP+TRV1	0.1%多菌灵溶液
5	超纯水	0.1%代森锰锌溶液
6	超纯水	0.1%多菌灵溶液

和转化成功。

2.2 TRV2-GFP-*LiCWIN* 在海滨石蒜鳞茎中的表达

侵染后暗培养 2 d 后,使用紫外灯照射处理组鳞茎块,发现空载体 TRV2-GFP 与基因沉默组的鳞片尖端、鳞片与基盘连接处、扎孔处等出现明显 GFP 荧光(图 5A),野生型(wild type, WT)对照组未出现荧光。在处理后的第 6 天的徒手切片中,通过激光扫描共聚焦显微镜观察到基因沉默组海滨石蒜鳞茎维管束及其周围的薄壁细胞有明显的 GFP 荧光,野生型对照组未观察到 GFP 荧光(图 5B)。利用标记

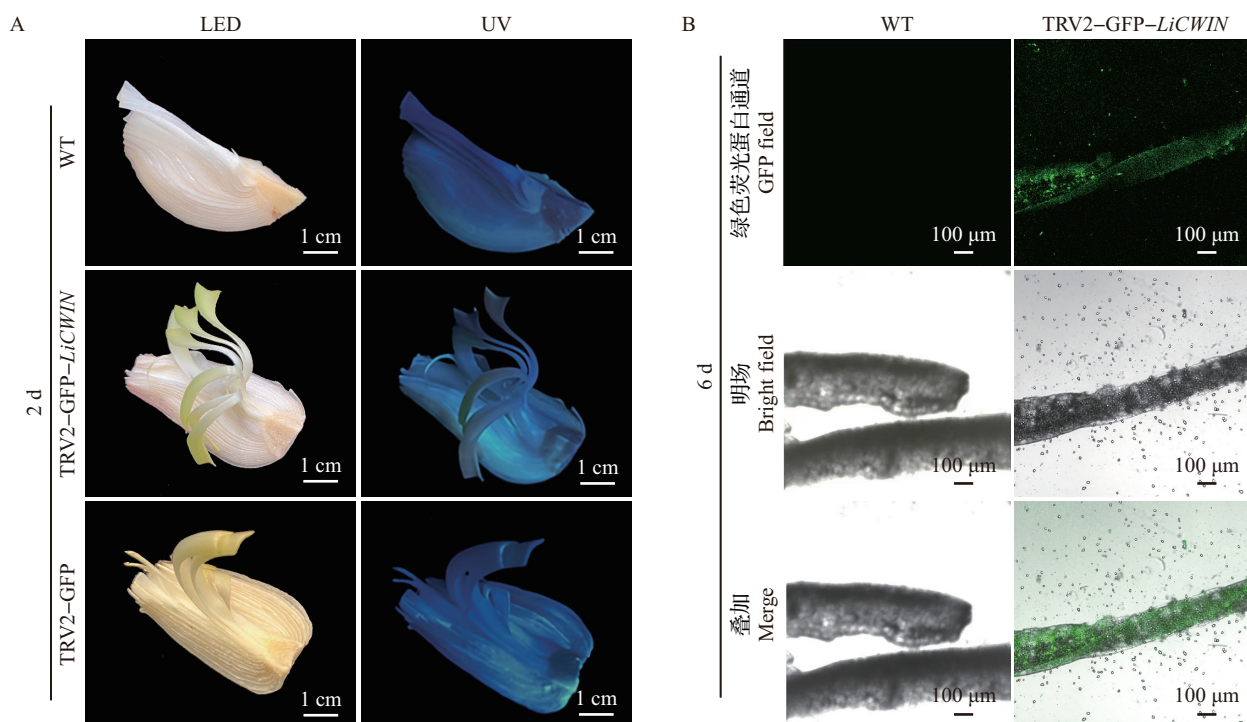
在 TRV2 载体上的 EGFP 编码的荧光,成功追踪到了病毒的动态变化,进一步证实 TRV 可以侵染海滨石蒜鳞茎,初步说明了 VIGS 体系构建成功。

2.3 目的基因沉默效果分析

设计特异性引物(表 1),使用 qRT-PCR 检测处理 2 d 后 *LiCWIN* 的表达量,结果表明,基因沉默组 *LiCWIN* 表达量显著下降($P<0.001$),其表达量约为空载体对照植株(TRV2-GFP)的 30%(图 6)。这表明 VIGS 体系在海滨石蒜中成功沉默了 *LiCWIN*。

2.4 *LiCWIN* 基因沉默对石蒜小鳞茎发生的影响

在农杆菌侵染海滨石蒜鳞茎 40 d 后观察小鳞茎

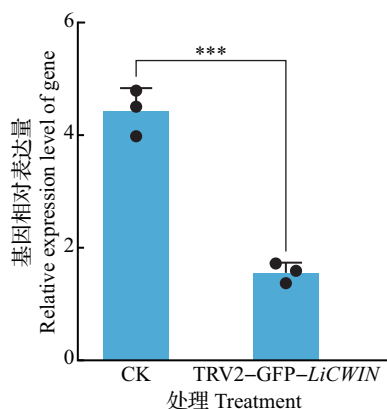


A. 发光二极管(light-emitting diode, LED)光源与紫外(ultraviolet, UV)光源下的 GFP; B. 共聚焦显微镜下报告基因 GFP 的表达。

A. GFP under LED light source and UV light source; B. Expression of reporter gene GFP under confocal microscopy.

图 5 报告基因 GFP 在海滨石蒜鳞茎中的表达

Fig. 5 Expression of reporter gene GFP in *Lycoris insularis* bulbs



CK: 空载体对照植株(下同)。***表示在 $P < 0.001$ 水平差异有统计学意义; $n=3$ 。

CK: Control plant with empty vector (the same as below). Triple asterisks (***) indicate significant differences at the 0.001 probability level; $n=3$.

图 6 qRT-PCR 检测 *LiCWIN* 基因表达量

Fig. 6 Expression level of *LiCWIN* gene detected by qRT-PCR

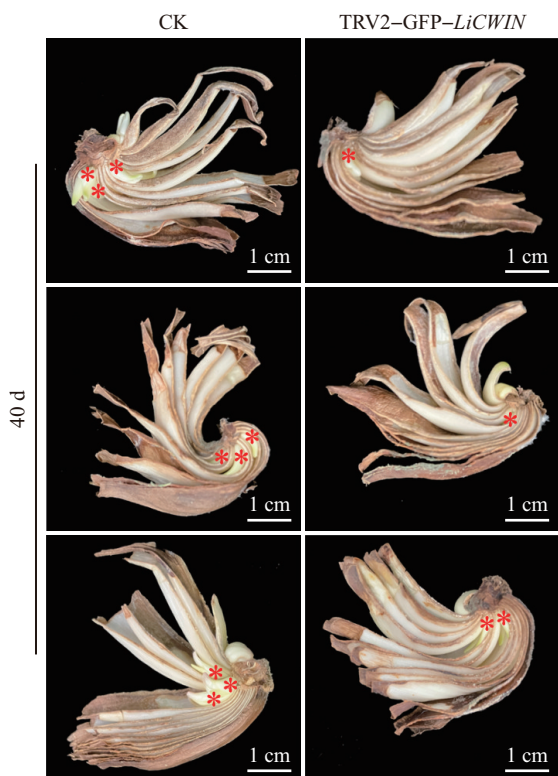
发生表型,发现 *LiCWIN* 基因沉默后,小鳞茎发育迟缓,且单个鳞茎块发生的小鳞茎数量较少,而空载体对照组的小鳞茎发育明显且发生数量较多(图 7)。进一步验证了 *LiCWIN* 在海滨石蒜小鳞茎发生过程

中的重要作用,本研究构建的 VIGS 体系在研究基因功能方面有一定的作用。

3 讨论与结论

3.1 以海滨石蒜鳞茎为外植体的 VIGS 沉默体系构建的意义

目前已报道的石蒜属植物 VIGS 体系主要选择花器官为外植体,如周洋丽等^[37]利用真空渗透法侵染换锦花花苞,将花柄浸于去离子水中暗培养 1 d,光照培养 2 d,发现 *LsMYB4*、*LsMYB5* 沉默后其表达量明显下降,花瓣尖端蓝色加深;郑正权等^[38]采用微量注射法转化花苞,侵染后 5 d 取样,发现 *LsMYB7* 沉默组花瓣变短且颜色变深。通常农杆菌介导的 VIGS 载体的侵染方法对基因沉默效率具有不同程度的影响,而这 2 项研究均能成功沉默目的基因。相较于注射法,真空渗透法对花苞损伤更大,故采用真空渗透法侵染后花苞的培养时间更短。在百合中,采用注射法侵染花被片,于 20 °C 培养箱中遮光处理 12 h 后转为正常光照,可持续培养 3~6 d^[33-35];而真空渗透侵染鳞片后,表型观察时间可延长至



红色星号表示小鳞茎发生点。

The red asterisk indicates the point of occurrence of bulblets.

图 7 *LiCWIN* 基因沉默后海滨石蒜小鳞茎发生情况观测

Fig. 7 Observation of the occurrence of bulblets of *Lycoris insularis* after *LiCWIN* gene silencing

15 d 以上^[31]。WANG 等对兰州百合鳞片抽真空操作 2 次后,依然能在培养基中培养鳞片至诱导出愈伤组织^[32]。

海滨石蒜叶期为 12 月中下旬至次年 4 月中下旬,花期为 8—9 月,果期为 10 月。相较于其他外植体,鳞茎可周年取材(图 8),全年开展实验。此外,

鳞茎自身富含养分,能够在侵染后的培育过程中延长表型观察期。因此,取材容易、更易培养的鳞茎是构建基因功能验证体系的适宜材料。

石蒜种子繁殖历时较长,需要进行 4~5 年的营养生长才能获得开花鳞茎^[46]。自然状态下,大部分石蒜属植物通常以分球的方式进行无性繁殖,只有当成熟鳞茎进入生殖生长期,分化的花芽抑制顶端优势,鳞茎才具有分球能力继而萌发腋芽^[47]。目前,石蒜属植物的批量扩繁生产主要依赖人工扦插繁殖^[48],通过切割培养后的鳞茎块可获得再生小鳞茎^[49-51]。相较于花苞等外植体,与百合鳞片相似,鳞茎更耐损伤,开展真空渗透侵染后可培养更长时间,切割后还能刺激小鳞茎发生。虽然瞬时沉默仅能使基因在 1 个月内低水平表达^[52],但我们发现经过基因沉默处理的鳞茎在 40 d 时仍与对照组有明显表型差异。本研究以海滨石蒜鳞茎为实验材料,成功实现了鳞茎的完整侵染,沉默基因的表型观察期长,为深入研究石蒜属植物的鳞茎发生发育关键调控基因的功能提供了重要支持。

3.2 实验关键环节的把控与优化

3.2.1 侵染球型、数量与取样部位的选择

本研究选择球径较小的海滨石蒜构建 VIGS 体系。在前期实验中,我们发现大球型海滨石蒜价格较高,且由于鳞片层数多,导致大球型海滨石蒜在清洗、消毒和侵染过程中都更耗费水和试剂,同时也更易腐烂和产生病虫害。相比之下,小球型海滨石蒜消毒方便,可更好地降低污染率,一次 VIGS 实验中可同时侵染更多个体,从而提高实验的重复率。鳞茎块数量越多,不同处理组分批次抽真空的

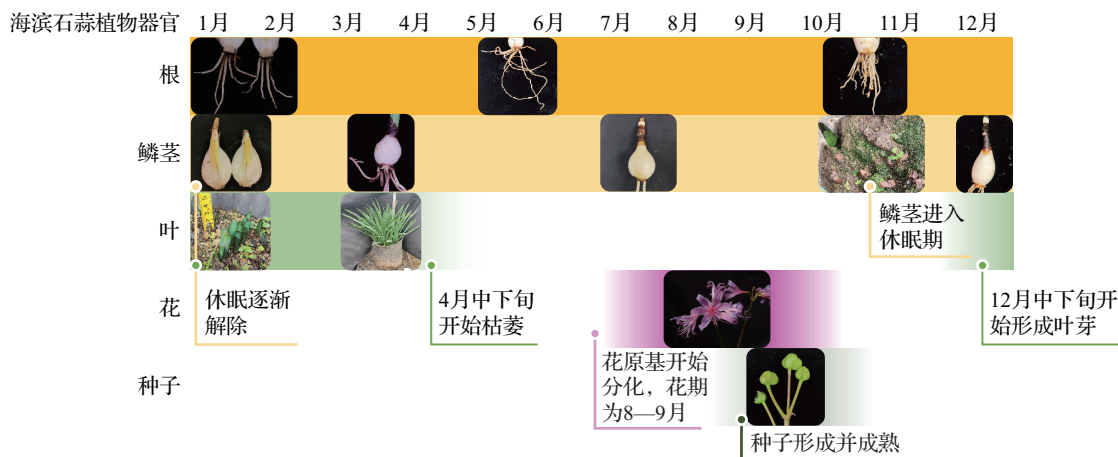


图 8 海滨石蒜年生长周期

Fig. 8 Annual growth cycle of *Lycoris insularis*

间隔时间越长,难以保证实验开展的同步性,这给后续统计与取样带来了困难。因此,鳞茎块的数量不宜过多。考虑到本研究的模板基因与小鳞茎发生发育相关且小鳞茎在基盘部位发生,为减少 qRT-PCR 过程中不同组织器官基因含量差异带来的影响并节约试剂,取样时应切除远离基盘的部分鳞片。

3.2.2 消毒灭菌与种球活性恢复

在进行 VIGS 实验前,对实验材料进行消毒灭菌是必不可少的环节。在鳞茎块数量一定的前提下,必须保持较低的污染率,才能确保有足够的鳞茎块以供取样。为了避免因植物组织坏死而引起污染增加,鳞茎侵染后应及时去除因实验操作而损伤严重的外层鳞片。所用器材需经过高压蒸汽灭菌后使用,实验过程中要用 75% 乙醇对手部及实验台面进行消毒,且在气培过程中要及时清除污染的鳞茎块,防止污染扩大。鳞茎在侵染前需要浸泡吸水以恢复生理活性,但浸泡会使鳞茎处于高湿度且缺氧的环境中,且浸泡时鳞茎尚未消毒,故长时间浸泡可能增加鳞茎污染和坏死的概率。由于本实验在冬季开展,室温较低,种球在干燥环境中贮存的时间较长,因此我们采取了隔夜浸泡的方法来恢复其活性。在实际操作中,应当依据种球状态、环境温度、环境湿度来确定浸泡时间,使鳞茎恢复活力即可。从资源圃现挖现用,或现买现用,实验效果更佳。

3.2.3 消毒药剂的选择

本实验前期还探究了不同消毒药剂与消毒时间对鳞茎块消毒效果的影响,重点比较了代森锰锌与多菌灵的消毒效果。代森锰锌纯品为白色粉末,工业品为灰白色或淡黄色粉末,难溶于水,不溶于大多数有机溶剂,故在加水稀释时应不断搅拌,以减少药剂沉淀和分布不均。代森锰锌能为植物提供锌元素,除了解决植物缺锌问题,还能增强植物抵抗病害的能力,从而起到杀菌作用。多菌灵是一种广谱性杀菌剂,对多种由真菌(如半知菌、多子囊菌)引起的作物病害有防治效果,可以有效防治由真菌引起的多种作物病害。本研究比较了这 2 种药剂的消毒效果,我们分别将代森锰锌与多菌灵稀释 1 000 倍并放入鳞茎块搅拌 30 min,在侵染后 6 d 再次对鳞茎块与气候箱喷施消毒药剂。结果表明,使用 0.1% 代森锰锌消毒的鳞茎块在培养 15 d 后初次出现污染,污染部位鳞片切割面与基盘出现少量白色絮状物,菌斑

症状不明显;清除污染鳞茎块,培养 20~30 d 时鳞茎块不再出现污染。而使用 0.1% 多菌灵消毒的鳞茎块在培养 1 周左右便出现污染,鳞片切割面与基盘出现白色絮状物,清除污染鳞茎块后污染仍难以控制。故代森锰锌的消毒效果优于多菌灵。

3.3 本研究中 VIGS 体系的适用性与展望

本研究成功构建了以海滨石蒜鳞茎为外植体的 VIGS 体系,并通过该体系有效沉默了与小鳞茎发生相关的基因 *LiCWIN*。在侵染后 2 d 观察到鳞茎块中 GFP 的表达,表明 TRV 成功侵染鳞茎;进一步的 qRT-PCR 检测结果显示,*LiCWIN* 表达量显著下降;侵染 40 d 后 *LiCWIN* 沉默的鳞茎块小鳞茎发育迟缓。上述结果证实了本研究构建的 VIGS 体系在海滨石蒜基因功能验证中的有效性。

基因功能瞬时验证体系对于揭示海滨石蒜生长发育、休眠和呼吸作用、环境响应和抗逆性等分子机制具有重要价值(图 9)。石蒜鳞茎基盘上着生密集的鳞叶及芽,可从顶芽或腋芽长出花茎并开花结果,因此,可通过鳞茎来验证参与小鳞茎发生、叶片发生和花发生过程基因的功能。球根植物普遍具有休眠期,故鳞茎可作为研究休眠分子机制的适宜材料。鳞片肥厚多肉,贮存着丰富的营养物质和水分,能适应干旱炎热的环境条件,是研究环境响应和抗逆性的理想材料。由于人工气候箱内的环境适宜小鳞茎发生与叶片发生,因此没有观察到鳞茎休眠现象^[53-54]。但本研究中,基因沉默处理引起的形态差异在第 40 天开始显现,这并不意味着载体沉默效果的持续时间,仍需分时段测定基因表达量来检测体系的沉默效果。在观察到不同处理组小鳞茎发生时间与数量的差异后,瞬时沉默是否对发生的小鳞茎本身产生影响尚不清楚。

本研究基于海滨石蒜所构建的全鳞茎侵染、最简化操作的同源瞬时沉默体系也适用于其他石蒜属植物。此外,本 VIGS 体系可为其他地下芽植物同源瞬时沉默提供方法参考。地下芽植物以球茎、鳞茎等形式贮存营养物质,地下器官可直接从种子或母器官上产生,这些地下器官理论上也适用于侵染和基因沉默^[55]。通过深入研究石蒜生长发育过程中关键基因的功能,本研究为分子标记辅助育种与传统育种方式的结合提供了理论依据,研究成果有望提高海滨石蒜繁殖率、缩短种球繁育周期,为解决海滨石蒜产业化生产中的问题提供参考。

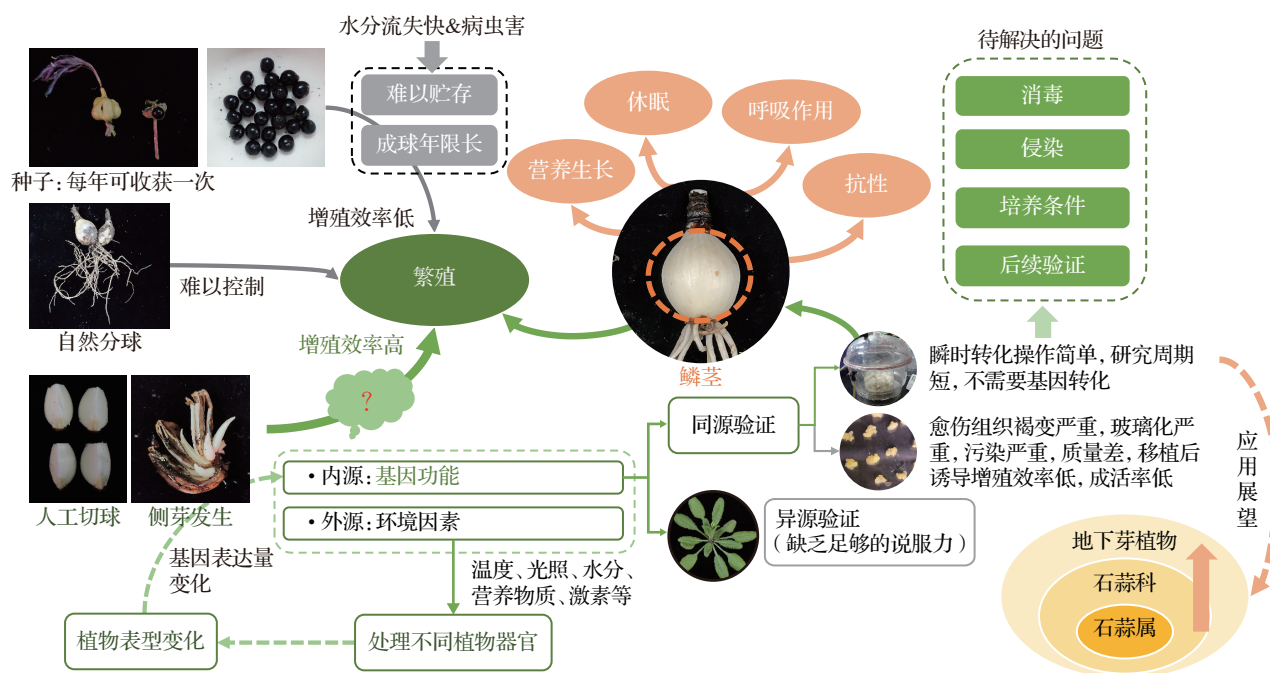


图9 石蒜属植物VIGS体系的构思

Fig. 9 Conception of VIGS system in *Lycoris* Herb.

参考文献(References):

- [1] LAMORAL-THEY S D, DECAESTECKER C, MATHIEU V, et al. Lycorine and its derivatives for anticancer drug design[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2010, 10(1): 41–50. DOI: 10.2174/138955710791112604
- [2] DING Y, QU D, ZHANG K M, et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2017, 19 (1): 53–100. DOI: 10.1080/10286020.2016.1198332
- [3] 黄宗春,胡一民. 安徽野生石蒜的种质资源及开发利用[J]. *中国林副特产*, 1997(3):46–47.
HUANG Z C, HU Y M. Germplasm resources and utilization of wild *Lycoris radiata* in Anhui Province[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 1997(3): 46–47. (in Chinese)
- [4] 常乐,夏宜平,陈菁珏,等. 一种恢复石蒜属种子活力的方法: CN102172218A[P]. 2011–09–07[2024–12–25].
CHANG L, XIA Y P, CHEN J J, et al. Method for restoring activity of inactive *Lycoris* seed: CN102172218A[P]. 2011–09–07[2024–12–25]. (in Chinese)
- [5] LIU W S, YUAN J S, Jr, STEWART C N. Advanced genetic tools for plant biotechnology[J]. *Nature Reviews: Genetics*, 2013, 14(11): 781–793. DOI: 10.1038/nrg3583
- [6] ZHANG J, TIAN J, TAI D Q, et al. An optimized TRV-based virus-induced gene silencing protocol for *Malus crabapple* [J]. *The Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 126(3): 499–509. DOI: 10.1007/s11240-016-1019-0
- [7] BUTT H I, YANG Z E, GONG Q, et al. *GaMYB85*, an R2R3 MYB gene, in transgenic *Arabidopsis* plays an important role in drought tolerance[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17: 142. DOI: 10.1186/s12870-017-1078-3
- [8] ZHANG F J, ZHUANG W B, SHU X C, et al. Complete chloroplast genome of *Lycoris sprengeri* (Amaryllidaceae) and genetic comparison[J]. *Mitochondrial DNA Part B-Resources*, 2019, 4(2): 3577–3578. DOI: 10.1080/23802359.2019.1676673
- [9] YANG F, LI C H, DAS D, et al. Comprehensive transcriptome and metabolic profiling of petal color development in *Lycoris sprengeri*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 747131. DOI: 10.3389/fpls.2021.747131
- [10] 王黎,周琪,高燕会. 石蒜属种间杂交种的鉴定和分子身份证构建[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, 39(3):562–570. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.20210296
WANG L, ZHOU Q, GAO Y H. Construction of molecular identification card of *Lycoris* interspecific hybrids[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, 39(3): 562–570. (in Chinese with English abstract)
- [11] 侯朔,高燕会,童再康. 换锦花 *LsMYB5* 基因的克隆与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(12):2164–2174. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2019.12.008
HOU S, GAO Y H, TONG Z K. Cloning and expression analysis of *LsMYB5* gene in *Lycoris sprengeri*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(12): 2164–2174. (in Chinese with English abstract)
- [12] 薛惠敏,周洋丽,高燕会. 换锦花花青素合成酶基因(*LsANS*)的克隆及启动子功能分析[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30 (8):1468–1479. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2022.08.003
XUE H M, ZHOU Y L, GAO Y H. Cloning and promoter function analysis of the anthocyanins synthase gene (*LsANS*) in *Lycoris sprengeri*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(8): 1468–1479. (in Chinese with English abstract)
- [13] 朱熠辰,薛惠敏,周琪,等. 乳白石蒜 *LaDFR1* 基因及启动子

- 克隆与功能研究[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(7): 1396–1404. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2023.07.006
- ZHU Y C, XUE H M, ZHOU Q, et al. Cloning and function study of *LaDFR1* gene and promoter from *Lycoris albiflora* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(7): 1396–1404. (in Chinese with English abstract)
- [14] WANG X, LI J J, GUO J, et al. The WRKY transcription factor PIWRKY65 enhances the resistance of *Paeonia lactiflora* (herbaceous peony) to *Alternaria tenuissima*[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 57. DOI: 10.1038/s41438-020-0267-7
- [15] TANG Y H, LU L L, HUANG X Q, et al. The herbaceous peony transcription factor WRKY41a promotes secondary cell wall thickening to enhance stem strength[J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(1): 428–445. DOI: 10.1093/plphys/kiac507
- [16] RÖSSNER C, LOTZ D, BECKER A. VIGS goes viral: how VIGS transforms our understanding of plant science[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2022, 73: 703–728. DOI: 10.1146/annurev-arplant-102820-020542
- [17] DOMMES A B, GROSS T, HERBERT D B, et al. Virus-induced gene silencing: empowering genetics in non-model organisms[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(1): 757–770. DOI: 10.1093/jxb/ery411
- [18] KUMAR G, KUMARI K, DASGUPTA I. RTBV-based VIGS vector for functional genomics in rice: methodology, advances, challenges, and future implications[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2408: 117–131. DOI: 10.1007/978-1-0716-1875-2_8
- [19] BURCH-SMITH T M, ANDERSON J C, MARTIN G B, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(5): 734–746. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x
- [20] HUANG C J, QIAN Y J, LI Z H, et al. Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics[J]. *Science China Life Sciences*, 2012, 55(2): 99–108. DOI: 10.1007/s11427-012-4280-4
- [21] ZHOU X P, HUANG C J. Virus-induced gene silencing using begomovirus satellite molecules[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 894: 57–67. DOI: 10.1007/978-1-61779-882-5_4
- [22] TIAN J, CHENG L, HAN Z Y, et al. Tobacco rattle virus mediated gene silencing in strawberry plants[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 120(3): 1131–1138. DOI: 10.1007/s11240-014-0669-z
- [23] WANG J Y, TANG Y F, YANG Y W, et al. Cotton leaf curl Multan virus-derived viral small RNAs can target cotton genes to promote viral infection[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1162. DOI: 10.3389/fpls.2016.01162
- [24] FAIVRE-RAMPANT O, GILROY E M, HRUBIKOVA K, et al. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1308–1316. DOI: 10.1104/pp.103.037507
- [25] SHEN Z D, YAO J, SUN J, et al. *Populus euphratica* HSF binds the promoter of *WRKY1* to enhance salt tolerance[J]. *Plant Science*, 2015, 235: 89–100. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.03.006
- [26] YE J, QU J, BUI H T N, et al. Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene functions by virus-induced gene silencing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(9): 964–976. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00457.x
- [27] 徐华. 百合 VIGS 体系的建立及 *LhDTX35* 基因的克隆和功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- XU H. Establishment of VIGS system and cloning and functional analysis of *LhDTX35* gene in *Lilium* spp.[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [28] ZHOU M Z, YAN C Y, ZENG Z, et al. *N*-methyltransferases of caffeine biosynthetic pathway in plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(52): 15359–15372. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c06167
- [29] ZHOU P, PENG J Y, ZENG M J, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese narcissus and its use in functional analysis of *NtMYB3*[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2021, 7(6): 565–572. DOI: 10.1016/j.hpj.2021.04.009
- [30] CHEN G Q, SONG J Y, ZHANG Y S, et al. Development and application of virus-induced gene silencing (VIGS) for studying ApTT8 gene function in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2024, 324: 112595. DOI: 10.1016/j.scienta.2023.112595
- [31] 王聪, 李炫岱, 王英姿, 等. 一种百合小鳞茎发生调控相关蛋白及其编码基因与应用: CN118207219A[P]. 2024-06-18 [2024-12-25].
- WANG C, LI W D, WANG Y Z, et al. Lily bulblet generation and regulation related protein as well as coding gene and application: CN118207219A[P]. 2024-06-18 [2024-12-25]. (in Chinese)
- [32] WANG S J, YI X Y, ZHANG L J, et al. Characterisation and expression analysis of *LdSERK1*, a somatic embryogenesis gene in *Lilium davidii* var. *unicolor*[J]. *Plants*, 2024, 13(11): 1495. DOI: 10.3390/plants13111495
- [33] 刘旭平, 王浩楠, 张茜, 等. 百合萜烯合成相关基因 *LiGGPPS* 大小亚基基因的克隆、表达及功能分析[J]. 西北农业学报, 2024, 33(3): 503–510. DOI: 10.7606/j.issn.1004-1389.2024.03.012
- LIU X P, WANG H N, ZHANG X, et al. Cloning, expression and functional analysis of *LiGGPPS.LSU* and *LiGGPPS.SSU* involved in flower fragrance synthesis in *Lilium*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2024, 33(3): 503–510. (in Chinese with English abstract)
- [34] FENG Y, GUO Z Y, ZHONG J, et al. The *LibHLH22* and *LibHLH63* from *Lilium* ‘Siberia’ can positively regulate volatile terpenoid biosynthesis[J]. *Horticulturae*, 2023, 9(4): 459. DOI: 10.3390/horticulturae9040459
- [35] YANG Y, BI M M, LUO K, et al. Lily (*Lilium* spp.) *LhERF061* suppresses anthocyanin biosynthesis by inhibiting *LhMYBSPLATTER* and *LhDFR* expression and interacting

- with LhMYBSPLATTER[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2025, 219: 109325. DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.109325
- [36] 徐幼平,徐秋芳,宋晓毅,等.病毒诱导的基因沉默[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2008,34(2):119-131. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9209.2008.02.001
- XU Y P, XU Q F, SONG X Y, et al. Virus-induced gene silencing[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2008, 34(2): 119-131. (in Chinese with English abstract)
- [37] 周洋丽,侯朔,郑正权,等.基于VIGS基因沉默体系的换锦花 *LsMYBs* 基因功能研究[J].农业生物技术学报,2020,28(6):974-983. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2020.06.003
- ZHOU Y L, HOU S, ZHENG Z Q, et al. Study on *LsMYBs* gene function in *Lycoris sprengeri* based on VIGS gene silencing system[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(6): 974-983. (in Chinese with English abstract)
- [38] 郑正权,赵梦婧,高燕会.换锦花 *LsMYB7* 基因克隆与功能研究[J].浙江农林大学学报,2024,41(3):586-596. DOI:10.11833/j.issn.2095-0756.20230368
- ZHENG Z Q, ZHAO M J, GAO Y H. Cloning and function analysis of *LsMYB7* gene in *Lycoris sprengeri*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2024, 41(3): 586-596. (in Chinese with English abstract)
- [39] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1985:25.
- Chinese Academy of Sciences. Editorial Committee of Flora of China. *Flora of China*[M]. Beijing: Science Press, 1985: 25. (in Chinese)
- [40] TIAN J, PEI H X, ZHANG S, et al. TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(1): 311-322. DOI: 10.1093/jxb/ert381
- [41] 赵准,胡文冉,邵武奎,等.陆地棉 *GhCNGC1* 基因克隆、表达和VIGS载体构建[J/OL].分子植物育种,2023. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231129.1729.006>.
- ZHAO Z, HU W R, SHAO W K, et al. Molecular cloning, expression and VIGS construction of *GhCNGC1* gene in *Gossypium hirsutum*[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231129.1729.006>. (in Chinese with English abstract)
- [42] RAHMAN J, BALDWIN I T, GASE K. California TRV-based VIGS vectors mediate gene silencing at elevated temperatures but with greater growth stunting[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 553. DOI: 10.1186/s12870-021-03324-8
- [43] BIAN T T, MA Y, GUO J, et al. Herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) *PIDELLA* gene negatively regulates dormancy release and plant growth[J]. *Plant Science*, 2020, 297: 110539. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110539
- [44] 尹俊程.紫花苜蓿适应NaCl胁迫的机理及VIGS体系探究[D].扬州:扬州大学,2023.
- YIN J C. Exploration of the mechanism of alfalfa adaptation to NaCl stress and VIGS system[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023. (in Chinese with English abstract)
- [45] 任梓铭.基于气培体系的石蒜属植物小鳞茎发生及发育机理研究[D].杭州:浙江大学,2019.
- REN Z M. Mechanisms of bullet formation and development in *Lycoris* based on aerial culture system[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [46] 吕玉华,童晋,龚子端,等.两种观赏石蒜的离体快速繁殖[J].四川大学学报(自然科学版),2005,42(6):1233-1237.
- LÜ Y H, TONG J, GONG Z D, et al. Vegetative propagation of two ornamental *Lycoris* in vitro[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2005, 42(6): 1233-1237. (in Chinese with English abstract)
- [47] 陈泓伟.石蒜双核型杂种幼花序培养再生作用及小植株建立[D].台北:台湾大学,2007.
- CHEN H W. Regeneration and plantlet establishment from young floret culture in dikaryotype hybrids of spider lily (*Lycoris* spp.)[D]. Taipei: Taiwan University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [48] KAMENETSKY R, OKUBO H. *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*[M]. Boca Raton: CRC Press, 2012.
- [49] BRYAN J E. *Bulbs*[M]. Rev. ed. Portland, Oregon: Timber Press, 2002.
- [50] 姚青菊,夏冰,彭峰.石蒜鳞茎切片扦插繁殖技术[J].江苏农业科学,2004(6):108-110.
- YAO Q J, XIA B, PENG F. Cuttage propagation by bulb incising in lycoris (*Lycoris radiata*)[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2004(6): 108-110. (in Chinese)
- [51] 李玉萍,张庆峰,汤庚国.石蒜(*Lycoris radiata*)种球的繁殖试验[J].南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(2):103-105. DOI:10.3969/j.issn.1000-2006.2005.02.025
- LI Y P, ZHANG Q F, TANG G G. Quick propagation of bulb-scale of *Lycoris radiata*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2005, 29(2): 103-105. (in Chinese with English abstract)
- [52] RYU C M, ANAND A, KANG L, et al. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species[J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(2): 322-331. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2004.02211.x
- [53] REN Z M, LIN Y F, LÜ X S, et al. Clonal bulblet regeneration and endophytic communities profiling of *Lycoris sprengeri*, an economically valuable bulbous plant of pharmaceutical and ornamental value[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 279: 109856. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109856
- [54] ZHANG J P, LI D Q, SHI X H, et al. Mining and expression analysis of candidate genes involved in regulating the chilling requirement fulfillment of *Paeonia lactiflora* 'Hang Baishao' [J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17: 262. DOI: 10.1186/s12870-017-1205-1
- [55] SHEIKH F R, JOSE-SANTHI J, KALIA D, et al. Sugars as the regulators of dormancy and sprouting in geophytes[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 189: 115817. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115817