

毛竹油菜素内酯受体激酶基因的分子特征及表达模式分析

王思宁, 孙化雨, 徐浩, 杨意宏, 赵韩生, 高志民*

(国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 国际竹藤中心竹藤资源基因科学研究所, 北京 100102)

摘要: 为探究毛竹(*Phyllostachys edulis*)油菜素内酯(brassinolide, BL)受体激酶基因的分子特征和表达模式, 采用生物信息学方法对毛竹中 BL 受体激酶基因进行了分析, 并应用实时定量 PCR 技术对基因的表达模式进行了研究。结果表明, 在毛竹基因组中共获得 8 条 BL 受体激酶基因同源序列(*PeBRLs*), 分别属于 4 个亚家族。8 个 *PeBRLs* 编码 858~1 224 氨基酸, 分子量为 92~130 kDa。PeBRLs 结构相对保守, 激酶区均具有 BL 受体激酶特有的 3 个保守结构域; 除 PeBRL1-1 具有 2 个跨膜结构域外, 其余 PeBRLs 只有 1 个跨膜结构域。8 个 PeBRLs 全部定位在细胞膜上, 属于典型的膜嵌合蛋白。实时定量 PCR 结果显示, 每个亚家族成员基因的组织特异性表达模式基本一致, 但不同亚家族之间差异明显; 在不同发育阶段的竹笋中, *PeBRLs* 的表达呈现为 4 种变化趋势。因此, 8 个 *PeBRLs* 在毛竹不同组织和笋的不同发育阶段可能发挥着不同的作用。

关键词: 毛竹; 油菜素内酯受体激酶基因; 生物信息学; 实时定量 PCR; 组织特异性表达

doi: 10.11926/jtsb.3818

Molecular Characteristics and Expression Analysis of Brassinolide Receptor Kinase Genes in *Phyllostachys edulis*

WANG Si-ning, SUN Hua-yu, XU Hao, YANG Yi-hong, ZHAO Han-sheng, GAO Zhi-min*

(State Forestry Administration Key Open Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Institute of Gene Science for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: In order to understand the molecular characteristics and expression patterns of brassinolide (BL) receptor kinase genes in *Phyllostachys edulis*, the characters of BL receptor kinase genes in *P. edulis* were analyzed by using bioinformatics methods, and their expression patterns were studied by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that there were eight BL receptor kinase homologous genes named *PeBRLs* in *P. edulis*, belonging to four subfamilies. The *PeBRLs* encoded proteins contained 858–1 224 amino acid residues with molecular weight of 92–130 kDa. All *PeBRLs* contained three conserved domains in the kinase region endemic to BL receptor kinase, which indicating the structure of *PeBRLs* were relatively conservative. Moreover, they all had one transmembrane structure except *PeBRL1-1* with two ones. All eight *PeBRLs* were predicted to be localized on the cell membrane belonging to the typical membrane chimeric protein. The results of qRT-PCR demonstrated that *PeBRLs* within subfamily had basically consistent expression patterns in different tissues, but there were obvious differences among *PeBRLs* in different subfamilies. The expression of *PeBRLs* showed four variation trends in bamboo shoots at different development stages. Therefore, it was suggested that

收稿日期: 2017-09-08

接受日期: 2017-11-08

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(201504106); “十二五”农村领域国家科技计划项目(2015BAD04B01)资助

This work was supported by the Special Projects for Scientific Research in Forestry Public Welfare Industry (Grant No. 201504106), and the National Science and Technology Planning Project for Rural Areas in the 12th Five-year (Grant No. 2015BAD04B01).

作者简介: 王思宁(1994~), 女, 硕士研究生。E-mail: wangsining66@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

PeBRLs might play different roles in different bamboo tissues and bamboo shoots at different development stages.

Key words: *Phyllostachys edulis*; Brassinolide receptor kinase gene; Bioinformatics; Quantitative real-time PCR; Tissue specific expression

油菜素内酯(brassinolide, BL)是一种与植物生长发育相关的植物激素,具有参与调节细胞的伸长和分裂^[1]、促进根的伸长和种子的萌发^[2]、加速叶片细胞的衰老^[3]、影响高等植物的开花周期^[4]、调节植物的光形态建成^[5]、增强光合作用强度^[6]、维管束分化^[7]、植物的育性、内源激素平衡^[6]等作用。对 BL 作用机制的研究表明,细胞受体通过接受 BL 激素信号刺激,将信号整合发生级联反应,促进下游靶基因的表达,进而参与调控植物生理生化过程^[8]。油菜素内酯受体激酶(brassinosteroid insensitive 1, BRI1)是直接和 BL 结合的唯一识别受体,在信号转导通路中起 BL 信号接收作用。

BRI1 定位于细胞膜上,由胞外受体区(extracellular domain)、跨膜区(transmembrane domain)和胞内激酶区(kinase domain)共 3 个部分组成^[9-10]。植物对 BL 的响应程度取决于 BRI1 受体激酶的数量^[11]。BL 通过与 BRI1 的胞外区结合,激活其胞内激酶区活性^[9,11-13]。BAK1 (BRI1-associated receptor kinase)与 BRI1 的胞内激酶区结合,通过 BRI1/BAK1 激酶复合体的转磷酸作用激活 BL 信号^[14-17],同时抑制因子(BRI1 kinase inhibitor 1, BKI1)与 BRI1/BAK1 复合体解离^[18-20],进而 BSK 激酶(brassinosteroid-signalling kinase)和 BSU1 磷酸酶(BRI1-suppressor 1)发生磷酸化,使 BIN2 激酶(brassinosteroid insensitive 2)去磷酸化失活^[14,21],并在细胞核中积累大量具有活性的 BZR 转录因子,促进 BL 靶基因表达,最终促进细胞伸长^[22]。

竹子具有速生的特点,能够在 2~3 个月内完成竹株的增高生长,在此过程中赤霉素、吲哚乙酸、油菜素内酯、玉米素和脱落酸等植物生长调节剂含量变化明显,他们之间的平衡对其快速生长发挥着重要调节作用^[23-26]。然而,关于竹子植物生长调节剂的信号转导的研究却鲜有报道,尤其是 BL 的信号转导途径尚未见报道。毛竹(*Phyllostachys edulis*)是我国种植范围最广,最具经济价值的竹种之一。毛竹基因组草图及其基因组数据库的完成^[27-28],为研究竹笋快速生长过程中的 BL 信号转导提供了便利。本研究以毛竹为材料,对参与毛竹 BL 信号转导的 BL 受体激酶同源基因进行全基因组分析与鉴

定,包括基因结构特征分析、蛋白质理化性质和亚细胞定位预测、保守结构域分析、进化关系和组织特异性表达分析等。另外,为验证基因在竹笋中的表达情况,采用实时定量 PCR 方法分析了 BL 受体激酶基因在不同发育阶段毛竹竹笋中的表达模式,以期为研究 BL 受体激酶基因在 BL 信号转导中的作用奠定基础,为全面揭示毛竹竹笋快速生长的调节机制提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以生长良好的毛竹(*Phyllostachys edulis*)为对象,选取 3 年生毛竹实生苗,分别取根(当年新发的幼嫩的根)、茎(当年生的幼茎)、未完全展开叶、完全展开叶、叶鞘和笋(高度为 2~10 cm),用于基因组表达特异性分析。从江西南昌野外生长的毛竹,分别取 0.2、1.0、3.0 和 6.7 m 高竹笋的基部,用于检测目的基因在竹笋不同发育阶段的表达情况。样品经液氮处理后,存储于-80℃冰箱中,用于提取 RNA。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

利用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 日本)提取各样本的总 RNA,使用 Recombinant DNase I 去除残余 DNA,并使用反转录试剂盒(Promega, 美国)合成 cDNA 第一条链,操作参照相关试剂盒说明书进行。

1.3 BL 受体激酶同源基因的获取与生物信息学分析

以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)中 BL 受体激酶基因 *AtBRI1* (NC_003075.7)、*OsBRI1* (XP_015621030)、*OsBRL1* (XP_015612606.1)、*OsBRL2* (XP_015615048.1)和 *OsBRL3* (XP_015650921.1)作为种子序列,利用已有毛竹基因组数据库 BambooGDB (<http://www.bamboogdb.org/>)^[28]进行 BLAST 获取毛竹中 BL 受体激酶的同源基因序列。使用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析获得目的基因的结构,用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析其编码蛋白的

理化性质,用 WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)预测目的基因表达蛋白的亚细胞定位。用 ClustalW^[29-30]比对同源序列并分析保守结构域,使用 Neighbor-Joining 法构建不同物种基于 BL 受体激酶的系统发育进化树。利用在线软件 TMHMM Server V. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测目的基因编码蛋白的跨膜结构域。

1.4 实时定量 PCR

根据获取的 BL 受体激酶基因同源序列,使用 Primer Premier 5.0 软件筛选设计适宜的定量引物(表 1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 实时定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used in quantitative real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
PeBRL1-1-F	TCCCTCAAGGTTCTCGACCT	PeBRL4-1-R	GTAAATGCGTTCGTGCCAGAG
PeBRL1-1-R	GGGTTACACCGGTGATGTT	PeBRL4-2-F	CACCGGTGGTGGCGTGAA
PeBRL1-2-F	TGGACCTCCGCGGCAAT	PeBRL4-2-R	TCCCGCACCGAAGCGCA
PeBRL1-2-R	TCAACAAGCTTTGGCAGCGA	PeBRL4-3-F	GCTATTCCGCTGTCTGCAT
PeBRL2-1-F	GACGCTGAGCCTGCTCGA	PeBRL4-3-R	CAGACTGCGACCAGCTGTCA
PeBRL2-1-R	GGCCGTTGTACGACAGGTTG	PeBRL4-4-F	TTCCGGTGATGCAGTTGGT
PeBRL3-1-F	GGCGAAGGAAGTTCGTTGAA	PeBRL4-4-R	AAGGTCCAACCACCGACT
PeBRL3-1-R	TTATGGGGCCTCCTGAGCTT	PeNTB-F	TCTTGTGTTGACACCGAAGAGGAG
PeBRL4-1-F	AGAACGAGGAGGTGAGTGGCT	PeNTB-R	AATAGCTGTCCTGGAGGAGTTT

利用 qTOWER2.2 (Analytik Jena, 德国) PCR 仪进行目的基因表达的定量分析,以毛竹 *PeNTB* 基因作为内参^[31],每个反应 3 次重复。反应体系体积为 10 μ L,包括 LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, 美国) 5.0 μ L,正、反向引物各 0.2 μ L,cDNA 0.8 μ L,ddH₂O 3.8 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 6 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,63 $^{\circ}$ C 12 s,共 45 个循环。利用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法^[32]分析基因的表达变化情况,采用 Excel 对数据进行分析并绘图。

类(*BRL1*、*BRL2*、*BRL3* 和 *BRL4*),分别命名为 *PeBRL1-1*、*PeBRL1-2*、*PeBRL2-1*、*PeBRL3-1*、*PeBRL4-1*、*PeBRL4-2*、*PeBRL4-3* 和 *PeBRL4-4*。8 个 *PeBRLs* 的编码区序列长度为 2 577~3 675 bp,对应的基因组序列长度为 2 770~3 675 bp。基因结构分析表明,*PeBRL1-1*、*PeBRL2-1*、*PeBRL4-2* 和 *PeBRL4-4* 不含内含子,*PeBRL1-2*、*PeBRL3-1*、*PeBRL4-1* 和 *PeBRL4-3* 含有 1 个内含子,长度分别为 193、239、67 和 103 bp,转录过程中内含子剪接属于 GT-AG 类型^[33](图 1)。

2 结果和分析

2.1 基因序列的获得和结构分析

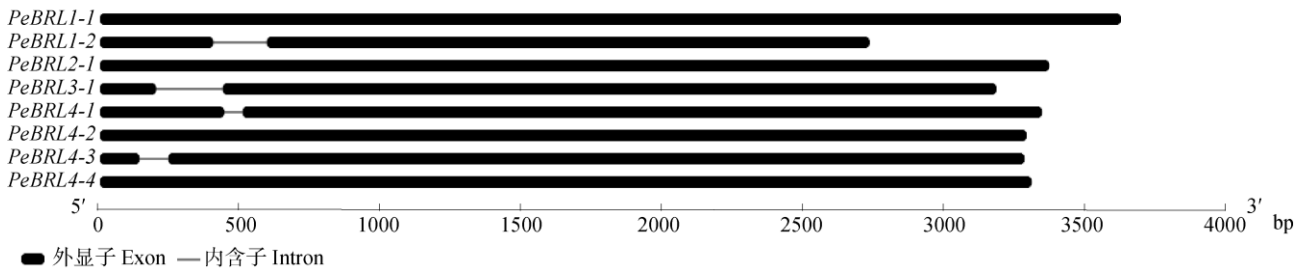
通过比对分析,从基因组数据库 BambooGDB 中共检索得到 BL 受体激酶基因同源序列 12 条,其中的 PH01000636G0280 不具有胞内激酶区的 ATP 结合保守结构位点,且亚细胞定位预测位点为细胞壁,与 BL 受体激酶为膜受体蛋白的结构功能不符;PH01001222G0530 缺少多肽底物结合位点;PH01002609G0090 和 PH01002795G0230 均不具有胞内激酶区的 3 个保守结构域。因此,以上 4 条基因序列不再进行分析。

根据编码蛋白的保守结构域,以及与模式植物水稻同源基因相似度和命名分类,将毛竹中具有完整保守结构域的 8 条 BL 受体激酶同源基因分为 4

2.2 蛋白质理化性质及亚细胞定位预测分析

PeBRLs 编码的肽链长度为 858~1 224 个氨基酸,分子量为 92~130 kDa;编码蛋白的不稳定系数为 29.12~34.04,均较稳定;脂肪系数为 95.86~109.65;平均亲水系数(GRAVY)为-0.067~0.305;理论等电点为 5.41~6.42,所编码的蛋白质均呈弱酸性。经过亚细胞定位预测,8 个 *PeBRLs* 均被定位在细胞膜上,属于典型的膜嵌合蛋白(表 2)。

PeBRL1-1 具有 2 个跨膜结构,跨膜区长度均为 23 个氨基酸;其余 *PeBRLs* 均具有 1 个跨膜结构,其中 *PeBRL3-1* 的跨膜区长度为 20 个氨基酸;*PeBRL1-2*、*PeBRL2-1*、*PeBRL4-1*、*PeBRL4-2*、*PeBRL4-3* 和 *PeBRL4-4* 的均为 23 个氨基酸。

图 1 *PeBRLs* 基因结构Fig. 1 Structure of *PeBRLs* genes表 2 *PeBRLs* 编码蛋白的理化性质和亚细胞定位预测Table 2 Putative basic physical and chemical characteristics, and subcellular localization of proteins encoding by *PeBRLs*

蛋白质 Protein	氨基酸 Amino acid	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	平均亲水系数 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
PeBRL1-1	1 224	130	5.94	32.31	100.35	0.130	细胞膜 Cell membrane
PeBRL1-2	858	92	6.42	31.04	95.86	0.044	细胞膜 Cell membrane
PeBRL2-1	1 138	122	6.22	33.27	100.21	0.044	细胞膜 Cell membrane
PeBRL3-1	995	107	5.41	29.12	103.21	0.128	细胞膜 Cell membrane
PeBRL4-1	1 107	119	5.43	32.63	95.88	-0.067	细胞膜 Cell membrane
PeBRL4-2	1 111	119	5.59	33.63	96.35	-0.036	细胞膜 Cell membrane
PeBRL4-3	1 074	115	5.83	31.86	96.77	-0.041	细胞膜 Cell membrane
PeBRL4-4	1 117	119	5.62	34.04	98.73	-0.010	细胞膜 Cell membrane

2.3 *PeBRLs* 编码蛋白保守性和进化分析

利用 ClustalW 对 *PeBRLs* 编码的氨基酸和模式植物水稻、拟南芥的 BRL/BRI 氨基酸序列进行比对分析, 结果表明, 与水稻、拟南芥相类似, 推测 *PeBRLs* 编码的蛋白在胞外受体区、跨膜区和胞内激酶区高度保守, 且具有富亮氨酸重复结构(LRRs); 胞内激酶区保守结构域特殊, 是决定 BRI1 激酶活性的关键区, 包括 3 个特有保守结构域, 分别是 ATP 结合位点(ATP binding site)、多肽底物结合位点(Polypeptide substrate binding site)和活性环结构(Activation loop)(图 2)。其推测编码的蛋白结构域的保守性表明 *PeBRLs* 可能与水稻、拟南芥中的同源蛋白具有相似的功能。

以毛竹、水稻和拟南芥中 BRI1/BRL1 同源蛋白氨基酸序列构建的系统进化树表明, 毛竹 8 个 *PeBRLs* 分别被聚类到 4 个分支。*PeBRL1-1*、*PeBRL1-2* 与 *OsBRL1*, *PeBRL2-1* 与 *OsBRL2*, *PeBRL3-1* 与 *OsBRL3*, *PeBRL4-1*、*PeBRL4-2*、*PeBRL4-3* 和 *PeBRL4-4* 与 *OsBRI1* 和 *AtBRI1* 分别聚类到一起, 其中 *PeBRL4-4* 与 *OsBRI1* 距离最近, 而与 *AtBRI1* 则距离较远(图 3)。

2.4 基因表达的组织特异性分析

组织表达结果表明, *PeBRL1-1*、*PeBRL1-2* 和 *PeBRL2-1* 在根中的表达量较高, 约为其他组织的 5 倍。*PeBRL3-1* 在根、茎、未完全展开叶中的表达量较高, 在完全展开叶、鞘和笋中的表达量均较低, 其在未完全展开叶中的表达量高于完全展开叶, 推测其可能参与了维管束发育的过程^[7]。*PeBRL4-1*、*PeBRL4-2*、*PeBRL4-3* 和 *PeBRL4-4* 的序列相似度最高, 表达模式也相似, 表达量均在未完全展开叶和叶鞘中较低, 在其他组织中较高, 且在完全展开叶的表达量明显高于未完全展开叶(图 4), 推测他们可能主要在成熟组织中发挥功能。基因的表达差异, 表明 *PeBRLs* 功能的不同, 具体情况尚需深入研究。

2.5 *PeBRLs* 基因在笋中的表达模式分析

实时定量 PCR 结果表明, *PeBRLs* 在笋中的表达模式表现为 4 种趋势(图 5)。(1) *PeBRL1-1*、*PeBRL1-2*、*PeBRL2-1* 和 *PeBRL4-4* 随笋的发育呈先上升后下降再上升的变化趋势, 4 个基因均以 1.0 m 笋中的表达量最高, *PeBRL1-1* 在 1.0 m 笋中的表达量约为对照(0.2 m)的 140 倍, 而在 3.0 m 笋

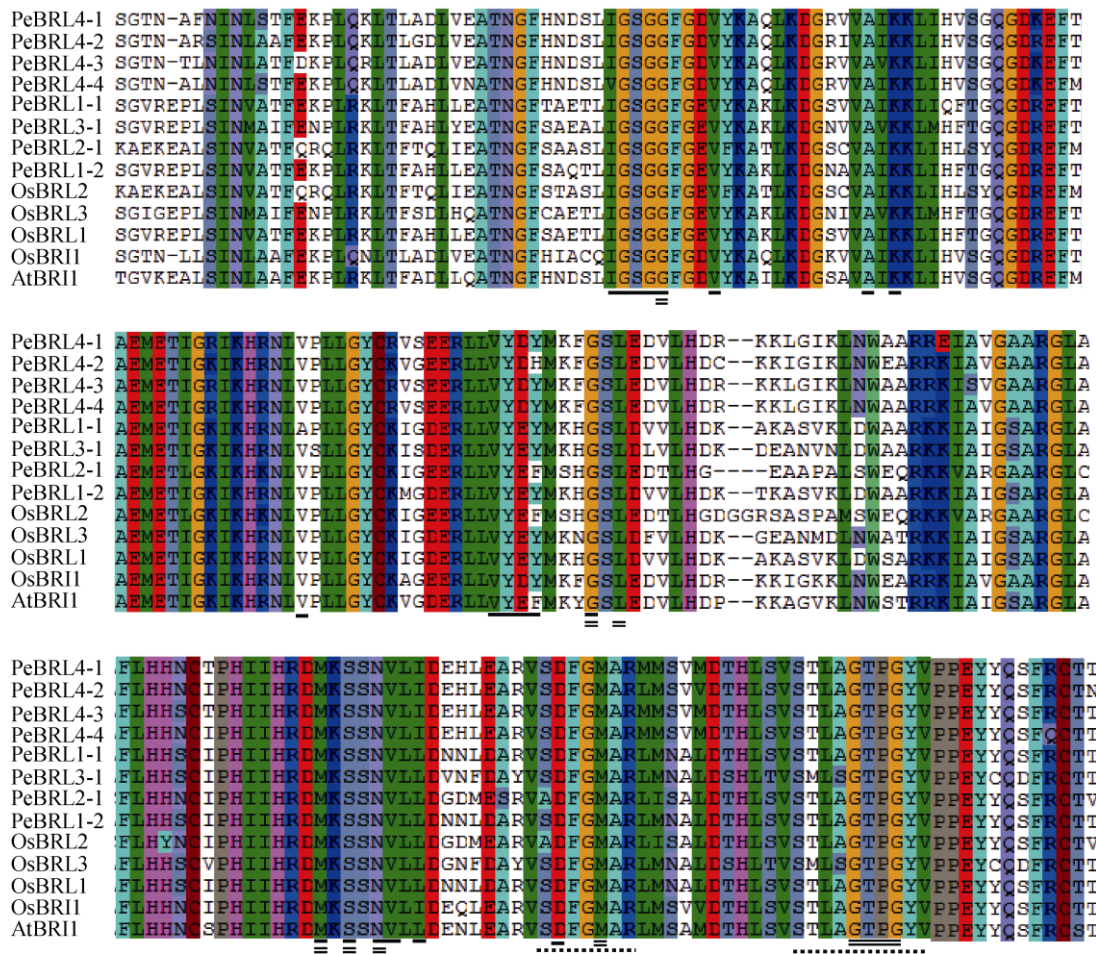


图 2 毛竹(Pe)、水稻(Os)和拟南芥(At)中 BL 受体激酶同源蛋白的胞内激酶区保守结构域分析。—: ATP 结合位点; =: 多肽底物结合位点; ----: 活性环结构。

Fig. 2 Analysis of kinase domain in homologous proteins of BL receptor kinase from *Phyllostachys edulis* (Pe), *Oryza sativa* (Os) and *Arabidopsis thaliana* (At). —: ATP binding site; =: Polypeptide substrate binding site; ----: Activation loop.

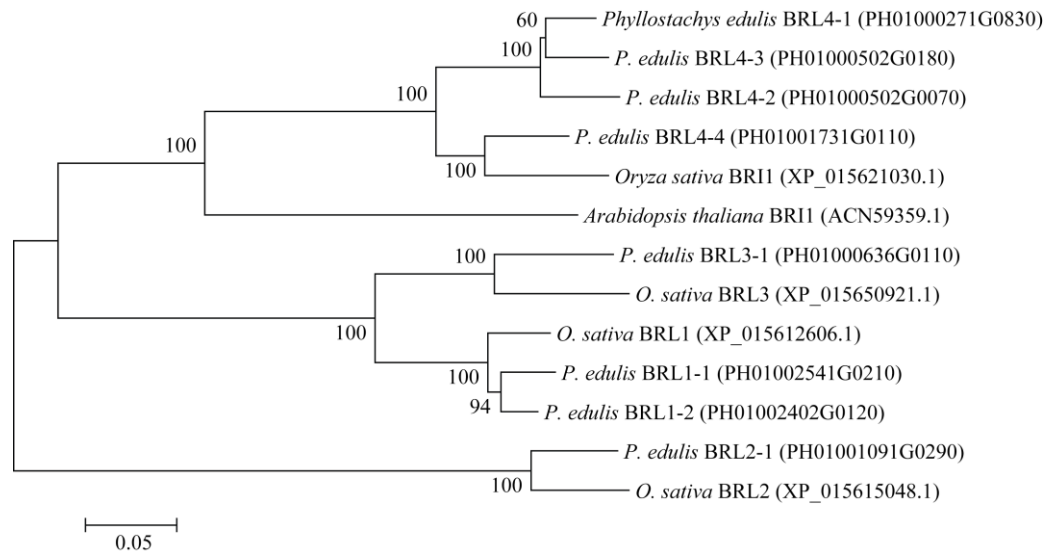


图 3 基于 BL 受体激酶蛋白氨基酸序列的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of BL receptor kinase proteins

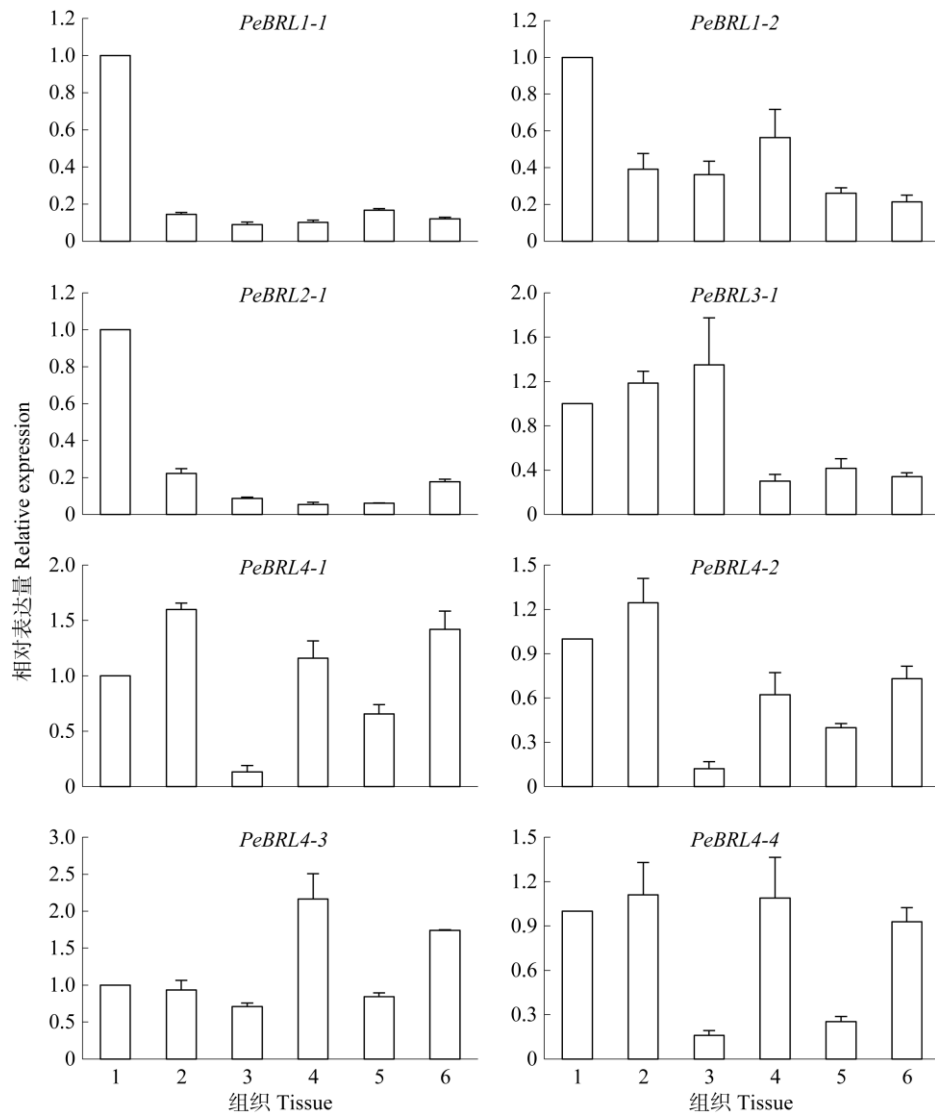
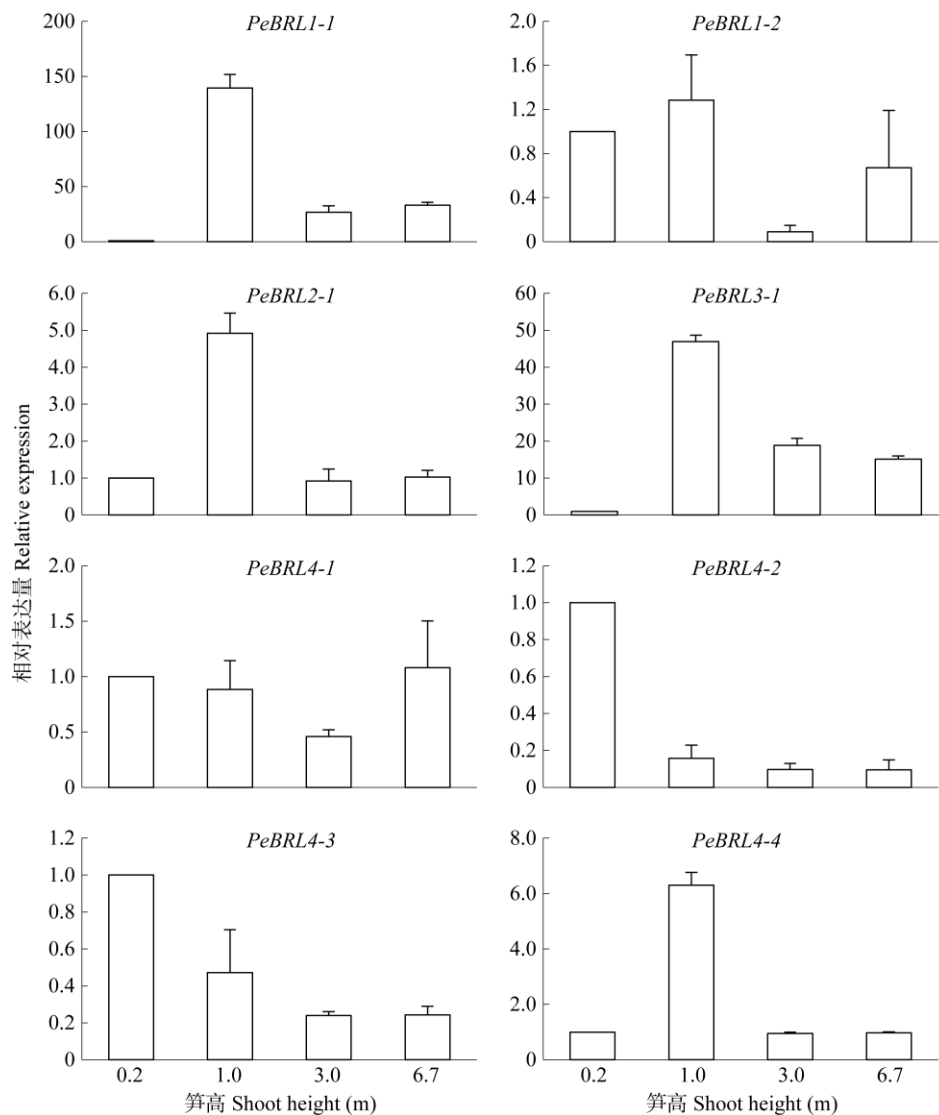


图 4 *PeBRLs* 在不同组织中的表达。1: 根; 2: 茎; 3: 未完全展开叶; 4: 完全展开叶; 5: 叶鞘; 6: 笋。

Fig. 4 Expression of *PeBRLs* in different tissues. 1: Root; 2: Stem; 3: Not fully expanded leaf blade; 4: Fully expanded leaf blade; 5: Leaf sheath; 6: Shoot.

中下降至约为对照 26 倍, 在 6.7 m 笋中又略上升约为对照的 33 倍, 推测 *PeBRL1-1* 可能是参与竹笋 BL 信号传导的关键基因; *PeBRL1-2* 在 1.0 m 笋中的表达量比 0.2 m 笋中略有上升, 而在 3.0 和 6.7 m 笋中均下降, 在 3.0 m 笋中的表达量最低, 仅约为对照的 1/10, 虽然 *PeBRL1-1* 和 *PeBRL1-2* 属于同一个亚家族且序列相似度较高, 但是基因表达差异明显, 这可能是由于基因的顺式作用元件差异引起的, 5' UTR Py-rich stretch 对基因具有高转录活性^[34], 在 *PeBRL1-1* 的启动子区含有 10 个 5' UTR Py-rich stretch, 而 *PeBRL1-2* 的启动子区仅含有 1 个; *PeBRL2-1* 和 *PeBRL4-4* 表达量变化趋势与 *PeBRL1-1* 的相近。

② *PeBRL3-1* 随笋的发育呈先上升后下降的变化趋势, *PeBRL3-1* 在 1.0 m 笋中的表达量达到最高, 约为对照的 47 倍, 随后持续下降, 但在 6.7 m 笋中仍约为对照的 15 倍。③ *PeBRL4-1* 随笋的发育呈先下降后上升的变化趋势, *PeBRL4-1* 在 1.0 m 和 3.0 m 笋中的表达量均低于对照(0.2 m 笋), 以在 3.0 m 笋中的最低, 约为对照的 1/2, 在 6.7 m 笋中的略高于对照(0.2 m 笋)。④ *PeBRL4-2* 和 *PeBRL4-3* 随笋的发育呈持续下降的变化趋势, *PeBRL4-2* 在 6.7 m 笋中的表达量最低, 约为对照的 1/10; *PeBRL4-3* 在 3.0 和 6.7 m 笋中的表达量相近, 约为对照的 1/5。

图 5 *PeBRLs* 在不同发育阶段笋中的表达Fig. 5 Expression of *PeBRLs* in bamboo shoots at different development stages

3 讨论

竹子可再生性强、材性好,被广泛用于建材、工艺品加工等多个方面,因此研究竹子生长发育特点及其速生机制等对于更好的利用竹材具有重要的意义。研究表明,赤霉素和油菜素甾醇在决定植物高度方面是最重要的调控因子^[18,35-37],油菜素内酯受体激酶在BL信号转导过程中发挥了极其重要的作用^[38]。利用模式植物拟南芥、水稻BL受体激酶基因^[39-40]同源比对,在毛竹中获得了12条同源基因,通过进一步分析其保守结构域,确定了编码蛋白具有完整BL受体激酶结构的基因8条,分别是水稻、拟南芥的2倍和8倍,这可能是与毛竹在

进化过程中经历了染色体加倍事件有关^[27]。

基因结构分析表明,毛竹8个*PeBRLs*基因长度差异较大(最大相差1098 bp),其中4个基因不含内含子,4个基因含有1个内含子,分别属于4个亚家族。*PeBRLs*呈弱酸性,性质稳定;均被定位在细胞膜上,作为膜受体发挥其生物功能^[21]。由此表明,虽然8个*PeBRLs*基因结构、理化性质存在差异,它们可能在细胞中发挥着不同的作用,但作为同一家族的不同成员,其基本的生物学功能是相似的。组织特异性表达结果表明,8个*PeBRLs*为组成型表达模式,在毛竹实生苗的根、茎和笋中的表达均高于在未完全展开叶、完全展开叶和叶鞘中的表达,这与毛竹不同组织的RNA-Seq表达谱相

一致^[27], 表明 *PeBRLs* 在毛竹生长过程中发挥着重要作用。

BL 作为一种微量高效的植物激素, 具有参与调节细胞的伸长和分裂的作用^[1], BL 受体激酶是与 BL 直接结合的膜受体蛋白, 在响应 BL 调节过程中发挥唯一识别受体的作用。转基因拟南芥过表达 *BRI1-GFP* 结合蛋白可以通过增加 BL 结合位点, 增加对 BL 的响应^[11]。竹笋中 8 个 *PeBRLs* 的表达随发育进程呈现 4 种变化趋势, 如 *PeBRL1-1*、*PeBRL3-1* 的表达量均呈现先上升后下降的变化趋势, 且在 1.0 m 笋中达到最高, 分别为对照的 140 倍和 47 倍, 而其他基因的表达量变化范围均在对照的 7 倍以内。这可能是由于 1.0 m 高的笋处于生长的指数增长阶段, 在响应发育的调控下 BL 受体激酶基因的表达量升高, 增加膜受体激酶数量和 BL 底物结合位点^[11], 进一步通过提高 BL 的结合效率, 在 BL 作用下促进笋的快速伸长, 以实现毛竹笋期快速生长。另外, 也有 BL 受体激酶基因(*PeBRL4-2* 和 *PeBRL4-3*)的表达随着竹笋高度的增加而呈现下降的趋势, 其原因有待于深入研究来揭示。

参考文献

- [1] CLOUSE S D, ZUREK D. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development [M]// CUTLER H G, YOKOTA T, ADAM G. Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications. Washington DC: American Chemical Society, 1991: 122–140. doi: 10.1021/bk-1991-0474.ch011.
- [2] DOMAGALSKA M A, SCHOMBURG F M, AMASINO R M, et al. Attenuation of brassinosteroid signaling enhances *FLC* expression and delays flowering [J]. *Development*, 2007, 134(15): 2841–2850. doi: 10.1242/dev.02866.
- [3] CHOE S, CHUNG Y. The regulation of brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2013, 32(6): 396–410. doi: 10.1080/07352689.2013.797856.
- [4] HOU X L, HU W W, SHEN L S, et al. Global identification of DELLA target genes during *Arabidopsis* flower development [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1126–1142. doi: 10.1104/pp.108.121301.
- [5] NAKAMOTO D, IKEURA A, ASAMI T, et al. Inhibition of brassinosteroid biosynthesis by either a *dwarf4* mutation or a brassinosteroid biosynthesis inhibitor rescues defects in tropic responses of hypocotyls in the *Arabidopsis* mutant *nonphototropic hypocotyl 4* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(2): 456–464. doi: 10.1104/pp.105.076273.
- [6] SASSE J M. Physiological actions of brassinosteroids: An update [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22(4): 276–288. doi: 10.1007/s00344-003-0062-3.
- [7] NOMURA T, SATO T, BISHOP J, et al. Accumulation of 6 deoxocathasterone and 6 deoxocasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(2): 171–178. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00440-4.
- [8] MANDAVA N B. Plant growth-promoting brassinosteroids [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988, 39(1): 23–52. doi: 10.1146/annurev.pp.39.060188.000323.
- [9] LI J M, CHORY J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. *Cell*, 1997, 90(5): 929–938. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80357-8.
- [10] FRIEDRICHSEN D M, JOAZEIRO C A P, LI J M, et al. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(4): 1247–1255. doi: 10.1104/pp.123.4.1247.
- [11] WANG Z Y, SETO H, FUJIOKA S, et al. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids [J]. *Nature*, 2001, 410(6826): 380–383. doi: 10.1038/35066597.
- [12] SHE J, HAN Z F, KIM T W, et al. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1 [J]. *Nature*, 2011, 474(7352): 472–476. doi: 10.1038/nature10178.
- [13] HOTHORN M, BELKHADIR Y, DREUX M, et al. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1 [J]. *Nature*, 2011, 474(7352): 467–471. doi: 10.1038/nature10153.
- [14] LI J M, NAM K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase [J]. *Science*, 2002, 295(5558): 1299–1301. doi: 10.1126/science.1065769.
- [15] WANG X F, KOTA U, HE K, et al. Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 220–235. doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.011.
- [16] CLOUSE S D. Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1219–1230. doi: 10.1105/tpc.111.084475.
- [17] GOU X P, YIN H J, HE K, et al. Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(1): e1002452. doi: 10.1371/journal.pgen.1002452.
- [18] JAILLAIS Y, HOTHORN M, BELKHADIR Y, et al. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor [J]. *Genes Dev*, 2011,

- 25(3): 232–237. doi: 10.1101/gad.2001911.
- [19] WANG X L, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane [J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1118–1122. doi: 10.1126/science.1127593.
- [20] WANG S H, KUREPA J, HASHIMOTO T, et al. Salt stress-induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1 [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3412–3427. doi: 10.1105/tpc.111.089920.
- [21] KIM T W, WANG Z Y. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61(1): 681–704. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092057.
- [22] YAMAMURO C, IHARA Y, WU X, et al. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1591–1606. doi: 10.2307/3871176.
- [23] DING X C. Dynamic analysis for endogenous phytohormones of bamboo shoots (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*) during different growth and differentiation stage [J]. *J Bamboo Res*, 1997, 16(2): 53–62.
丁兴萃. 毛竹笋体生长发育过程中内源激素的动态分析 [J]. 竹子研究汇刊, 1997, 16(2): 53–62.
- [24] DONG L L, ZHAO H S, LI L C, et al. Expression characteristics and promoter activity analysis of *PeSCL3* gene from *Phyllostachys edulis* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2016, 24(3): 252–258. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.002.
董丽莉, 赵韩生, 李利超, 等. 毛竹 *PeSCL3* 基因表达特征及其启动子活性研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 252–258. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.002.
- [25] ZHANG C L. The comprehensive analysis of shoot-culm and study of auxin-related genes of *Phyllostachys edulis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences, 2014: 24–30.
张春玲. 毛竹笋-竹生长发育过程系统分析与生长素相关基因研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014: 24–30.
- [26] JIANG K Y, ZHOU M B. Recent advances in bamboo molecular biology [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2014, 22(6): 632–642. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2014.06.012.
- [27] PENG Z H, LU Y, LI L B, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461. doi: 10.1038/ng.2569.
- [28] ZHAO H S, PENG Z H, FEI B H, et al. BambooGDB: A bamboo genome database with functional annotation and an analysis platform [J]. *Database*, 2014, 2014: bau006. doi: 10.1093/database/bau006.
- [29] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acid Res*, 1994, 22(22): 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- [30] NEBERT D W, GONZALEZ F J. P450 genes: Structure, evolution, and regulation [J]. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56(1): 945–993. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004501.
- [31] FAN C J, MA J M, GUO Q R, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573. doi: 10.1371/journal.pone.0056573.
- [32] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [33] MOORE M J, QUERY C C, SHARP P A. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome [M]// GESTELAND R F, ATKINS J F. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993: 303–357.
- [34] ZHANG J, ZHANG X Y, WANG Y Q, et al. Characterization of sequence elements from *Malvastrum* yellow vein betasatellite regulating promoter activity and DNA replication [J]. *Virology*, 2012, 9: 234. doi: 10.1186/1743-422X-9-234.
- [35] CLOUSE S D, SASSE J M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 427–451. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427.
- [36] TAIZ L, ZEIGER E. *Plant Physiology* [M]. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002: 461–488.
- [37] FUJIOKA S, YOKOTA T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 137–164. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921.
- [38] HONG Z, UEGUCHI-TANAKA M, UMEMURA K, et al. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf (d2)*, is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450 [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 2900–2910. doi: 10.1105/tpc.014712.
- [39] HATEGAN L, GODZA B, KOZMA-BOGNAR L, et al. Differential expression of the brassinosteroid receptor-encoding *BRI1* gene in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2014, 239(5): 989–1001. doi: 10.1007/s00425-014-2031-4.
- [40] ZHAO H S, DONG L L, SUN H Y, et al. Comprehensive analysis of multi-tissue transcriptome data and the genome-wide investigation of GRAS family in *Phyllostachys edulis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27640. doi: 10.1038/srep27640.