

毛竹 *PeSCL3* 基因表达特征及其启动子活性研究

董丽莉, 赵韩生, 李利超, 孙化雨, 王丽丽, 高志民*

(国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 为探讨毛竹(*Phyllostachys edulis*) *SCL3* 基因的表达特征及其启动子活性, 采用同源克隆的方法从毛竹中分离到 *SCL3* 同源基因 *PeSCL3* 的编码区(ORF)和上游启动子序列(*PeSCL3p*)。序列分析表明, *PeSCL3* 的 ORF 为 1335 bp, 推测编码含 444 氨基酸的蛋白, 该蛋白与水稻(*Oryza sativa*)的 *SCL3* 同源性高达 93.9%。*PeSCL3p* 长度为 1358 bp, 含有脱落酸(ABA)应答元件 ABRE、赤霉素(GA₃)应答元件 GARE-motif 和 P-box、干旱诱导 MYB 结合位点等多种作用元件。实时定量 PCR 分析结果表明, *PeSCL3* 在毛竹叶中的表达丰度最高, 其次是茎和根, 而鞘中的最低; *PeSCL3* 的表达受 GA₃ 的抑制, 受 ABA、NaCl 和干旱的诱导。转 *PeSCL3p::GUS* 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 GUS 染色结果表明, 根尖、顶端生长点和子叶叶柄均被染成蓝色, 尤其根尖的染色最深。这表明 *PeSCL3* 对毛竹的生长发育, 尤其是根系, 可能起着重要的调控作用。

关键词: 毛竹; *PeSCL3*; 基因表达; 启动子活性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.002

Expression Characteristics and Promoter Activity Analysis of *PeSCL3* Gene from *Phyllostachys edulis*

DONG Li-li, ZHAO Han-sheng, LI Li-chao, SUN Hua-yu, WANG Li-li, GAO Zhi-min*

(International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: In order to reveal the expression characteristics and promoter activity of *SCL3* in *Phyllostachys edulis*, the open reading frame (ORF) of *PeSCL3* and its upstream promoter sequence (*PeSCL3p*) were cloned from *P. edulis* by using homologous cloning method. Sequence analysis showed that the length of *PeSCL3* ORF was 1335 bp, encoding a protein with 444 amino acids, which shared 93.9% homology with *SCL3* from *Oryza sativa*. The length of *PeSCL3p* was 1358 bp, containing many kinds of *cis*-acting regulatory elements, such as abscisic acid response (ABRE), gibberellin-responsive element (GARE-motif and P-box), and drought-induced MYB binding sites, etc. Based on real-time quantitative PCR, the expression of *PeSCL3* in leaf was the highest, following by stem and root, and the least in sheath. Besides, the expression of *PeSCL3* was inhibited by GA₃, while it was induced by ABA, NaCl and drought. The GUS staining result of transgenic *Arabidopsis thaliana* with *PeSCL3p::GUS* showed that root tip, apical meristem and cotyledon petiole were all stained blue, especially in root tip with the deepest staining. So, these indicated that *PeSCL3* might play an important role in regulating the growth and development of *P. edulis*, especially for that of root.

Key words: *Phyllostachys edulis*; *PeSCL3*; Gene expression; Promoter activity

收稿日期: 2015-07-31 接受日期: 2015-09-09

基金项目: 国际竹藤中心基本科研业务费专项资金项目(1632015008); 国家自然科学基金项目(31400557); 国家科技支撑计划课题(2015BAD04B01)资助

This work was supported by the Fundamental Research Funds for International Center for Bamboo and Rattan (Grant No. 1632015008), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31400557), and the National Science and Technology Pillar Program (Grant No. 2015BAD04B01).

作者简介: 董丽莉, 女, 硕士, 研究方向为竹藤花卉分子育种。E-mail: lxhs0108@163.com

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

植物主要依靠根系从土壤中吸收水分和养分, 满足生长发育、新陈代谢等生理活动, 根系形态建成(Root system architecture, RSA)对植物生长发育具有重要作用。植物依靠调控 RSA 来适应复杂多变的土壤环境, 尽管 RSA 具有很高的可塑性, 且不同物种的差异较大, 但植物的根系形态和可塑性是由内部的遗传因子决定的^[1], 植物自身内部蛋白、转录因子、microRNAs 及激素等均参与 RSA 的调控^[2-5]。*SCARECROW-LIKE3 (SCL3)*编码的转录因子属于 GRAS 家族成员, *SCL3* 的 mRNA 主要在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根内皮层中表达^[6], 在调控植物根的伸长方面发挥重要的作用, DELLA 诱导 *SCL3* 基因的表达, 而 GA 抑制其表达, 而且 *SCL3* 和 DELLA 通过蛋白间的互作在调控下游 GA 响应和 GA 体内平衡的方面起着相反的作用^[7-9]。在拟南芥的根部, *SCL3* 作为 GAI 和 RGA 的衰减子调控伸长区/分化区细胞的伸长, *SCL3-DELLA* 互作调节的 GA 信号途径与 SHR/SCR 途径联合共同调控分裂区基本组织的分裂时间和程度^[10]。因此, *SCL3* 对植物根系的生长发育具有重要调控作用。

毛竹(*Phyllostachys edulis*)是我国最具特色的笋材两用竹种, 根系的生长为其竹笋、竹材的快速生长奠定了基础, 种植期前 5 年地上部分生长并不明显, 但其地下根系水平方向伸展超过 10 m, 垂直生长也接近 5 m。因此, 研究根系的生长发育调控对于深入了解毛竹的速生机制具有重要意义。对毛竹根系构型特征的研究表明, 实生苗的根长、根系数量、根表面积、根体积与根系平均直径在不同土层中的分布存在极显著差异^[11]。对黄山地区毛竹根系生物量的分布规律研究表明, 88.8%的根系分布在 0~40 cm 的土层, 随土层加深生物量减少^[12]。然而, 毛竹根系生长发育的内在调控分子机制尚属空白。毛竹基因组草图^[13]的完成以及数据库分析平台^[14]的建成为其根系发育与调控机制研究奠定了基础。本研究以毛竹为材料, 克隆 *SCL3* 的同源基因 *PeSCL3* 及其启动子序列, 对基因表达和启动子活性进行分析, 为进一步揭示 *PeSCL3* 调控毛竹根系生长发育的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

以半年生盆栽毛竹(*Phyllostachys edulis*)实生苗

为材料, 栽培基质为腐殖土: 蛭石=3:1, 在 25℃、光照 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 和光/暗=16 h/8 h 的条件下培养。

分别用 GA₃ (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$)、ABA (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 溶液喷洒毛竹叶片, 分别在 GA₃ 处理后 0、0.25、0.5、1、3 和 5 h, ABA 处理后 0、1、3、6、12 和 24 h 采集根系样品^[15]。用 NaCl (200 mmol L^{-1}) 溶液一次性浇灌毛竹, 同时对另一部分毛竹进行控水干旱处理, 分别在处理 0、2、5、9、14 和 20 d 后收集毛竹根系样品^[16]。所有样品用液氮速冻处理, 置于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取及 cDNA 合成

以毛竹叶片为材料, 采用改良 CTAB 法^[17]提取基因组 DNA, -20℃ 保存备用。采用 Trizol 法^[18]分别提取毛竹的根、茎、叶和鞘的 RNA, 以及不同处理叶片的 RNA, 按照 Promega 公司的反转录试剂盒操作说明书合成 cDNA, 在 -20℃ 保存备用。

1.3 基因及其启动子的克隆

根据拟南芥转录因子 AtSCL3 (At1g50420) 蛋白序列在毛竹基因组数据库 (<http://www.bamboogdb.org>) 中查找同源基因序列, 采用 MEGA 6.0 软件基于目的基因编码的氨基酸序列构建系统进化树, 利用在线平台 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析上游调控序列所含作用元件, 应用 DNASTAR 软件对目的基因与其他物种的同源性进行分析。

根据 ORF 设计引物 SCL3-F: 5'-ATGGTACATGACGAAGGCTCCTCGTC-3' 和 SCL3-R: 5'-TCAGTCGAACCTGCGGCCGC-3'。PCR 反应体系 (20 μL): 5×Primer STARTM Buffer 4.0 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol L^{-1}) 1.6 μL , 引物 SCL3-F (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 1.0 μL , 引物 SCL3-R (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 1.0 μL , DNA 2.0 μL , Primer STARTM HS DNA polymerase (5 U) 0.2 μL , DMSO 1.0 μL , 超纯水 9.2 μL 。PCR 程序: 94℃ 预变性 10 min; 然后 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

设计启动子两端序列引物, SCL3p-F: 5'-AGA-GGGAAGACGCACGGATCCAG-3', SCL3p-R: 5'-CAGCCTCACCAGCGCTGCC-3'。PCR 反应体系 (20 μL): 5×Primer STARTM Buffer 4.0 μL , dNTP Mixture 1.6 μL , 引物 SCL3p-F 1.0 μL , 引物 SCL3p-R 1.0 μL , 毛竹基因组 DNA 1.0 μL , Primer STARTM HS

DNA polymerase 0.2 μL , DMSO 1.0 μL , 超纯水 10.2 μL 。PCR 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 BioMIGE 公司回收试剂盒, 回收后加 A 连接到 pGEM-T easy 载体上, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans5 α , 筛选出阳性克隆, 送生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 基因的表达分析

根据 *PeSCL3* 基因序列的非保守区设计定量引物, qSCL3-F: 5'-AGGTCGCGAGGAGAAGG-3'和 qSCL3-R: 5'-ACGCAGCGAGGTGAAG-3'。qPCR 反应在耶拿 QTower 仪器上进行, 采用 Roche Light-Cycler[®] 480 SYBR Green I Master 试剂盒, 反应体系 (10 μL) 包含 5.0 μL Mix, 0.8 μL cDNA, 正、反向引物各 0.2 μL , 3.8 μL ddH₂O。以毛竹 *NTB* 为内参基因^[19], 引物分别为 NTB-F (5'-TCTTGTGTTGACACCGAAGAGGAG-3') 和 NTB-R (5'-AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT-3'), 每个反应重复 3 次。利用 2^{- $\Delta\Delta\text{C}_t$} 法^[20] 分析 3 次生物学实验的数据, Excel 进行作图。

1.5 启动子载体构建与转化

根据表达载体 pBI101 多克隆位点及 *PeSCL3* 启动子序列设计引物, 分别在正反向引物序列 5'端加酶切位点 *Sal* I (GTCGAC) 和 *Xba* I (TCTAGA), 即 SCL3p-F(S): 5'-ACGCGTTCGACAGAGGGAAGACGCACGGATCCAG-3', SCL3p-R(X): 5'-GCTCTAG-AAGCCTCACCAGCGCTGCC-3'。经 PCR 扩增后回收产物, 连接到 pGEM-T easy 上, 转化大肠杆菌, 选择阳性单克隆序列测序。将测序正确的质粒和载体 pBI101 分别用 *Sal* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 分别回收连接, 获得 *PeSCL3p::GUS* 融合表达载体。酶切验证后, 采用电击法将含有目的基因的植物表达载体质粒转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 中, 菌落经 PCR 鉴定后, 阳性克隆用于转化拟南芥 Col-0。采用浸花法^[21] 进行转化, 筛选阳性 (Kan 50 mg L⁻¹) 植株用于启动子活性分析。

1.6 启动子活性分析

按照试剂盒 (货号: RTU4032, 中科瑞泰生物科技有限公司) 说明, 配制 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 染色液 [将 0.1 mL 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -葡萄糖苷酸酯 (X-

gluc), 加入到 5 mL 的 GUS 染色缓冲液中], 现配现用。GUS 染色步骤: 将野生型拟南芥、转基因阳性植株幼苗分别浸泡在 GUS 染色液中, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1 h 至过夜。将幼苗转移至 70% 乙醇中脱色 2~3 次至阴性对照呈白色。观察脱色后的幼苗, 呈现蓝色的部位为启动子发挥活性的位点, 拍照记录。

2 结果和分析

2.1 基因及其启动子的克隆

从毛竹基因组数据库获得了拟南芥 *AtSCL3* 同源基因序列 FP097535, 该基因的全长 1978 bp, 5' UTR 长 340 bp, 3' UTR 长 303 bp, ORF 长 1335 bp, 命名为 *PeSCL3*。分别以毛竹基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 用引物 SCL3-F 和 SCL3-R 进行 PCR 扩增, 电泳检测到在 1400 bp 左右均有 1 条特异性条带。测序结果表明, 片段大小均为 1335 bp, 与 FP097535 的编码区完全一致, 表明 *PeSCL3* 没有内含子。推测 *PeSCL3* 编码 444 个氨基酸, 除了包含 GRAS 家族的 5 个保守基序 (LRI、VHIID、LRII、PFYRE 和 SAW) 外, 还含有 *AtSCL3* 亚家族的特有基序, 说明它属于 GRAS 转录因子家族的 *AtSCL3* 亚家族。

利用 DNASTAR 软件进行同源性分析, 结果表明毛竹 *PeSCL3* 与其他物种的 SCL3 的同源性达 55% 以上, 其中与水稻 (*Oryza sativa*) 的 *OsSCL3* 同源性高达 93.9%, 表明其进化上的保守性。用 MEGA6.0 软件构建基于 SCL3 同源序列的系统进化树, 结果表明 *PeSCL3* 与单子叶植物水稻、高粱 (*Sorghum bicolor*) 和玉米 (*Zea mays*) 等的 SCL3 聚在一起, 双子叶植物拟南芥、葡萄 (*Vitis vinifera*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 和可可 (*Theobroma cacao*) 的 SCL3 聚类在另一分支 (图 1), 这与植物的系统分类结果相一致。

以毛竹基因组 DNA 为模板, 用引物 SCL3p-F 和 SCL3p-R 进行 PCR 扩增, 结果表明, *PeSCL3* 上游调控序列为 1358 bp, 除含有 TATA、CAAT-box 启动子基本元件外, 还包含 ABA 应答元件 ABRE, 赤霉素应答元件 GARE-motif 和 P-box, 低温应答顺式作用元件 LTR, 干旱诱导 MYB 结合位点 MBS, 光应答元件 G-Box 等多种作用元件, 这意味着 *PeSCL3* 的表达可能受到激素以及低温、干旱等非生物胁迫的调控。

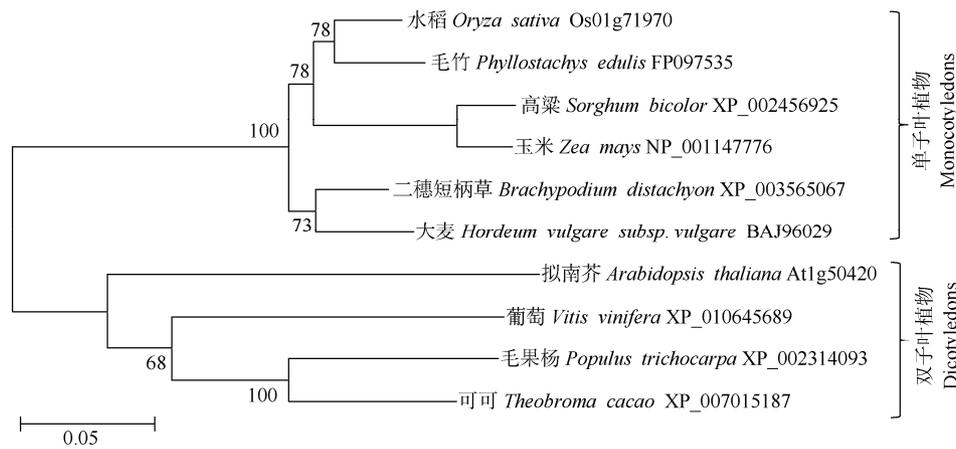


图 1 基于 SCL3 氨基酸序列构建的系统进化树。分支上的数字为 1000 次重复搜索的靴带值。

Fig. 1 Phylogenetic tree based on sequences of SCL3. Numbers on branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicates.

2.2 基因的表达分析

基因的时空特异表达是植物完成生理功能的必要条件, 研究 *PeSCL3* 的组织表达特异性有助于揭示其功能。qPCR 结果表明, *PeSCL3* 在毛竹的各组织中均有表达, 以叶片中的表达丰度最高, 其次是茎和根, 而叶鞘的最低(图 2)。这说明 *PeSCL3* 可能对毛竹的根、茎、叶片和叶鞘的生长发育均有一定的影响。

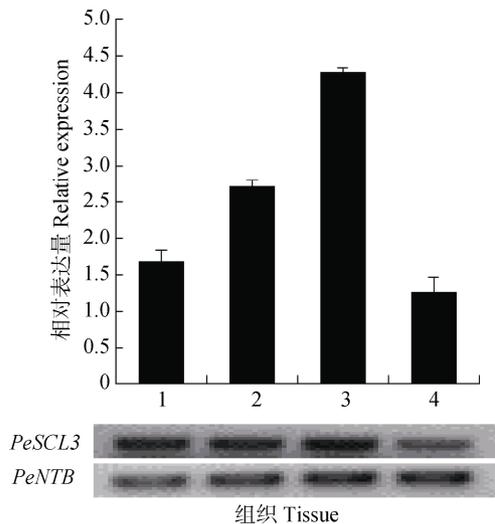


图 2 *PeSCL3* 基因在不同组织中的表达。1: 根; 2: 茎; 3: 叶片; 4: 叶鞘。

Fig. 2 Expression of *PeSCL3* in different tissues. 1: Root; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Sheath.

2.3 不同处理对根系中基因表达的影响

PeSCL3 在 GA_3 处理 0.5 h 后表达量明显下降, 仅为 0 h 的 21%, 随后其表达逐渐恢复, 处理 5 h 的表

达量与 0 h 的相近(图 3), 表明 *PeSCL3* 的表达总体是受到 GA_3 抑制的, 但其自身具有一定的调节能力。

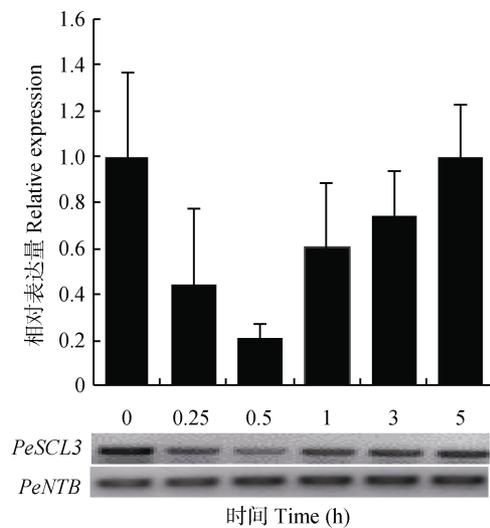


图 3 GA_3 处理后 *PeSCL3* 的表达

Fig. 3 Expression analysis of *PeSCL3* after GA_3 treatment

ABA 处理后, 前 6 h 内 *PeSCL3* 表达量逐渐上升, 处理 6 h 的表达量是 0 h 的近 1.8 倍, 但处理 12 h 的表达量下降为 0 h 的 35%, 而处理 24 h 的表达量又上调至 0 h 的 1.2 倍(图 4), 这可能与毛竹自身的昼夜节律调节有关, 但总体来讲 *PeSCL3* 表达受 ABA 的诱导。

NaCl 处理前期, *PeSCL3* 的表达量不断上升, 处理 9 d 时 *PeSCL3* 的表达量是 0 d 的 7.6 倍, 以后随处理时间的延长, *PeSCL3* 的表达量逐渐下降, 处理 21 d 时 *PeSCL3* 的表达量比 9 d 时降低了 78%, 但

仍是 0 d 的 1.6 倍(图 5), 表明 *PeSCL3* 的表达受 NaCl 处理的诱导。

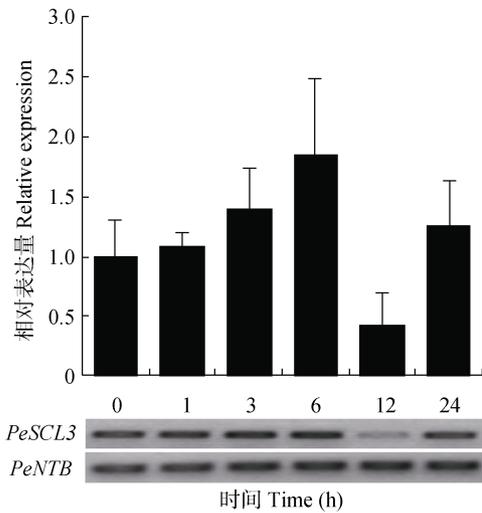


图 4 ABA 处理后 *PeSCL3* 的表达

Fig. 4 Expression analysis of *PeSCL3* after ABA treatment

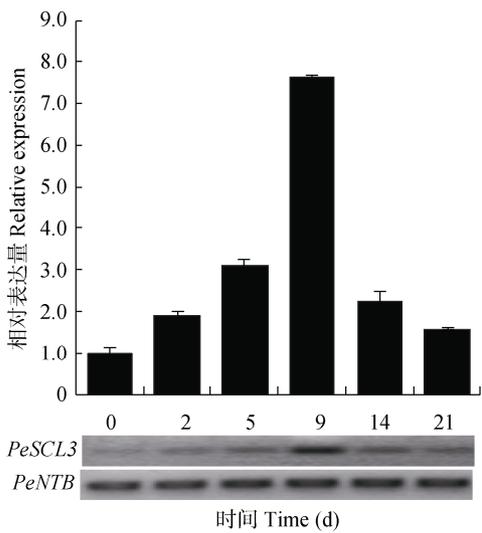


图 5 NaCl 处理后 *PeSCL3* 的表达

Fig. 5 Expression of *PeSCL3* after NaCl treatment

在自然干旱控水条件下, 在 0~5 d 内 *PeSCL3* 的表达量急剧上升, 处理 5 d 时 *PeSCL3* 的表达量是 0 d 的 42.4 倍, 以后 *PeSCL3* 的表达量急剧下降并趋于稳定, 处理 21 d 时 *PeSCL3* 表达量为 0 d 的 3.4 倍(图 6), 表明 *PeSCL3* 基因的表达受干旱的诱导。

2.4 启动子表达载体构建和检测

以包含启动子序列的质粒为模板, 用引物

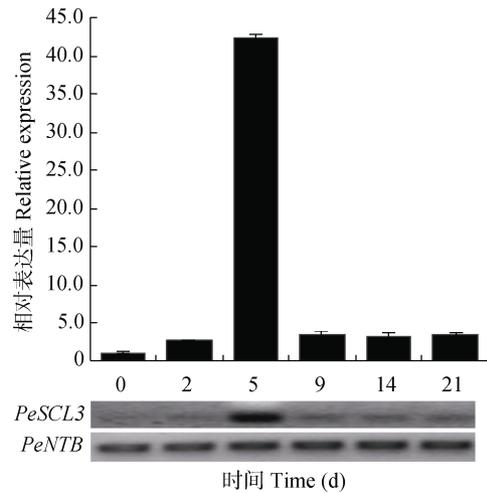


图 6 干旱处理后 *PeSCL3* 的表达

Fig. 6 Expression of *PeSCL3* after drought treatment

PeSCL3p-F(S)和 *PeSCL3p*-R(X)进行 PCR 扩增, 回收后连到 pGEM-T easy 载体上并测序。利用 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切, 将测序正确的启动子序列插入到 pBI101 表达载体的多克隆位点, 构建了包含 *PeSCL3p*::*GUS* 融合的表达载体(图 7)。利用电击法将 *PeSCL3p*::*GUS* 融合表达载体转入农杆菌 GV3101 中, 以单克隆菌液为模板, 用 *PeSCL3p*-F(S)和 *PeSCL3p*-R(X)进行 PCR 验证, 结果获得 1 条大约 1.3 kb 的特异条带(图略), 说明农杆菌中含有目的序列, 可以用于下一步实验。

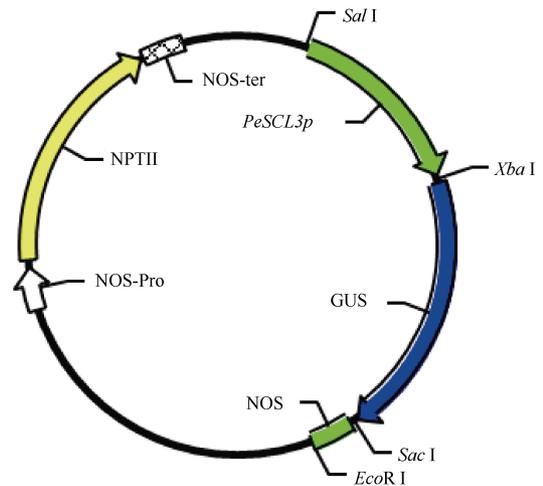


图 7 *PeSCL3p*::*GUS* 融合表达载体

Fig. 7 Expression vector of *PeSCL3p*::*GUS*

2.5 启动子活性分析

利用农杆菌介导法转化拟南芥, 通过抗性筛

选, 获得 8 株抗性植株并进行 GUS 染色。可观察到 *PeSCL3p::GUS* 转基因植株的根尖、顶端生长点和子叶叶柄被染成蓝色, 其中根尖部位染色最深, 其次是顶端生长点, 染色最浅的是子叶叶柄(图 8: A), 而野生型拟南芥没有染上蓝色(图 8: B)。由此表明, *PeSCL3* 主要在根尖部位表达, 这与拟南芥的 *SCL3* 主要在根中表达相符^[6], 意味着 *PeSCL3* 可能对植物根的生长发育起着重要的调控作用。



图 8 *PeSCL3* 启动子的活性分析。A: 转 *PeSCL3p::GUS* 株系(箭头示染色部位); B: 野生型(Col-0)。

Fig. 8 Activity of *PeSCL3* promoter. A: Transgenic line of *PeSCL3p::GUS* (arrows showing dyeing sites); B: Wild type (Col-0).

3 讨论

发达的根系是毛竹快速生长所必需的, 从土壤中吸收水分和必要的矿质养分是根系的主要功能, 研究根系的生长发育调控有助于全面了解毛竹的整体发育状况。GRAS 家族是植物中特有的一类转录因子家族^[22], 其中 *AtSCL3* 亚家族是 GRAS 家族的一个分支, 在根的伸长方面发挥重要作用^[7,10]。本研究获得的 *PeSCL3* 编码的转录因子属于 *AtSCL3* 亚家族, 具有 GRAS 家族共有的保守结构域, 这意味着其功能的相似性, *PeSCL3* 可能参与调控毛竹根系生长发育。对 *PeSCL3* 基因表达模式的分析表明, 其在根、茎、叶片和叶鞘中均有表达,

但表达量差异较大, 以叶的表达丰度最高, 其次是茎和根, 这说明 *PeSCL3* 除了对根的生长和发育有影响外, 对茎和叶的发育也有潜在的影响。这与转 *PeSCL3p::GUS* 基因植株的 GUS 染色结果相符, 除了根尖部位染色最深外, 顶端生长点和子叶叶柄也被染成蓝色。但对毛竹 *PeSCL3* 基因的具体功能尚需进一步研究。

很多激素信号转导途径通过调控基因或转录因子来参与调控植物的根系发育, 如生长素、细胞分裂素、油菜素内酯和赤霉素等均参与调控根系的生长发育^[23]。同时, 非生物胁迫也是影响根系生长的重要因素, 如盐胁迫和干旱主要是引起细胞破坏和扰乱渗透平衡^[24], 改变基因表达的环境, 进而影响基因的表达。高等植物中 ABA 和 GA 可以对立地调控许多的发育过程及对生物或非生物胁迫的反应^[25]。DELLA 是赤霉素(GA)信号的关键负调控因子, 对拟南芥 *SCL3* 功能研究表明 DELLA 和 *SCL3* 水平的平衡共同调控下游基因的表达^[9], 而 DELLA 和 *SCL3* 在调控下游 GA 反应中起着相反的作用, 而且 *SCL3* 通过干扰 DELLA 来下调自身的表达^[7]。在 *PeSCL3* 的启动子序列 *PeSCL3p* 中含有 ABA、GA₃ 等激素响应元件以及干旱、光等非生物胁迫响应元件, GA₃ 处理后 *PeSCL3* 的表达受到抑制, 而 ABA、NaCl 和干旱处理后则受到诱导, 这进一步佐证了对毛竹 *PeSCL3* 启动子序列所包含元件的分析预测, 同时也表明该基因可能与毛竹的干旱响应、逆境调节相关。然而, ABA 和 GA 以及非生物胁迫是如何通过影响上游调控序列来影响 *PeSCL3* 的表达, 进而调控毛竹根系的发育, 还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] OSMONT K S, SIBOUT R, HARDTKE C S. Hidden branches: Developments in root system architecture [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 93–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104006.
- [2] KUBO M, UDAGAWA M, NISHIKUBO N, et al. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(16): 1855–1860. doi: 10.1101/gad.1331305.
- [3] WYSOCKA-DILLER J W, HELARIUTTA Y, FUKAKI H, et al. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot [J]. *Development*, 2000, 127(3): 595–603.
- [4] KHAN G A, DECLERCK M, SORIN C, et al. MicroRNAs as

- regulators of root development and architecture [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77(1-2): 47-58. doi: 10.1007/s11103-011-9793-x.
- [5] PETRICKA J J, WINTER C M, BENFEY P N. Control of *Arabidopsis* root development [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 563-590. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105501.
- [6] PYSH L D, WYSOCKA-DILLER J W, CAMILLERI C, et al. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes [J]. *Plant J*, 1999, 18(9): 111-119. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00431.x.
- [7] ZHANG Z L, OGAWA M, FLEET C M, et al. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 2160-2165. doi: 10.1073/pnas.1012232108.
- [8] ZENTELLA R, ZHANG Z L, PARK M, et al. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3037-3057. doi: 10.1105/tpc.107.054999.
- [9] YOSHIDA H, UEQUCHI-TANAKA M. DELLA and SCL3 balance gibberellin feedback regulation by utilizing INDETERMINATE DOMAIN proteins as transcriptional scaffolds [J]. *Plant Sign Behav*, 2014, 9(9): e29726. doi: 10.4161/psb.29726.
- [10] HEO J O, CHANG K S, KIM I L, et al. Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator SCARECROW-LIKE3 in the *Arabidopsis* root [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 2166-2171. doi: 10.1073/pnas.1012215108.
- [11] GUO Q R, CHEN H, FENG Y, et al. Study on root-system architecture of *Phyllostachys edulis* seedlings by rhizobox method [J]. *J CS Univ For Techn*, 2014, 34(4): 6-9. doi: 10.3969/j.issn.1673-923X.2014.04.002.
郭起荣, 陈红, 冯云, 等. 用根箱法研究毛竹实生苗根系构型 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2014, 34(4): 6-9. doi: 10.3969/j.issn.1673-923X.2014.04.002.
- [12] CHEN H, FENG Y, ZHOU J M, et al. Root biomass distribution and seasonal variation of *Phyllostachys edulis* [J]. *Ecol Environ Sci*, 2013, 22(10): 1678-1681. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2013.10.006.
陈红, 冯云, 周建梅, 等. 毛竹根系生物量分布与季节动态变化 [J]. *生态环境学报*, 2013, 22(10): 1678-1681. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2013.10.006.
- [13] 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): 456-561. doi: 10.1038/ng.2569.
- [14] 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.
- [15] MA H S, LIANG D, SHUAI P, et al. The salt-and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(14): 4011-4019. doi: 10.1093/jxb/erq217.
- [16] YANG L. Cloning of *PeZFP* and *PeMYB* genes and functional analysis of *PeZFP* gene in *Phyllostachys edulis* [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2011: 1-46.
杨丽. 毛竹抗逆相关基因 *PeZFP* 和 *PeMYB* 基因的克隆及 *PeZFP* 基因功能验证 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2011: 1-46.
- [17] GAO Z M, FAN S H, GAO J, et al. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, 19(6): 725-728. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2006.06.009.
高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA 的探讨 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6): 725-728. doi: 10.3321/j.issn:1001-1498.2006.06.009.
- [18] GAO Z M, LI X P, LI L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chin For Sci Techn*, 2006, 5(3): 52-54.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735-743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
- [22] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. *Planta*, 2004, 218(5): 683-692. doi: 10.1007/s00425-004-1203-z.
- [23] BENKOVÁ E, HEJÁTKO J. Hormone interaction at the root apical meristem [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(4): 383-396. doi: 10.1007/s11103-008-9393-6.
- [24] MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: An overview [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 444(2): 139-158. doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018.
- [25] LIN Q B, WU F Q, SHENG P K, et al. The SnRK2-APC/C^{TE} regulatory module mediates the antagonistic action of gibberellic acid and abscisic acid pathways [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7981. doi: 10.1038/ncomms8981.