

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.011

杨树油菜素内酯合成基因 *DET2* 的克隆与功能分析

李泽华¹, 杜娟², 贺学娇¹, 赵树堂¹, 刘颖丽¹, 卢孟柱^{1*}

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 浙江大学生命科学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: [目的] *DET2* 基因编码一个 5 α -还原酶, 是油菜素内酯 (BRs) 合成过程中的关键限速基因。研究 *DET2* 基因在杨树生长发育中的作用, 对于进一步研究油菜素内酯在木本植物中的调控机制有重要意义。[方法] 从银腺杨 84K (*Populus alba* \times *P. glandulosa*, '84K') 克隆得到拟南芥 *AtDET2* 同源基因 *PagDET2*, 利用生物信息学对其进行序列比对、生化特征分析、构建系统发育进化树。通过 RT-PCR 分析其在杨树中的表达模式。构建由 CaMV 35S 强启动子驱动的过表达载体, 通过农杆菌介导的叶盘转化法转化 84K 杨, 得到 *PagDET2-OE* 转基因植株。分析过表达 *DET2* 基因对于转基因植株内源 BRs 含量、植株生长和抗逆的影响。[结果] 克隆了包含全长编码区 *PagDET2* 基因全长, 可编码一个长度为 257 个氨基酸的蛋白质。其蛋白序列与毛果杨、拟南芥、水稻、棉花、大豆、番茄 *DET2* 蛋白同源性较高, 说明该基因在进化过程中相对保守。*PagDET2* 在 84K 杨不同组织中均检测到表达, 其在茎中的表达较高。通过 ELISA 检测植物 BRs 含量发现, 过量表达 *DET2* 可以显著提高杨树内源 BRs 含量。过量表达 *DET2* 基因, 可以导致转基因植株的高生长, 但对盐胁迫更加敏感。[结论] *DET2* 基因作为 BRs 合成的关键基因, 在杨树中过量表达可以显著提高内源 BRs 含量, 促进植株增高。*DET2* 转基因植株的获得为进一步分析 BR 参与木本植物生长发育的调控机制奠定了基础。

关键词: *DET2*; 银腺杨 84K; 过量表达; 油菜素内酯; 高生长

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)02-0085-08

油菜素内酯 (BRs) 作为一种重要的植物激素, 存在于植物的各个器官中^[1] 参与植物幼苗生长、细胞伸长、细胞壁形成等许多生长发育过程^[2-3], 并且参与了植物对干旱、低温、高盐等逆境胁迫的响应^[4]。

目前, 关于 BRs 的生物合成途径已研究的较为清楚。Fujioka 等人通过悬浮培养的长春花 (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) 细胞系统, 以油菜甾醇 (CR) 作为 BRs 合成的起始物阐明了 BRs 合成的基本途径^[5-6]。通过对拟南芥突变体的研究表明, 在 BRs 的合成过程中有几个比较重要的基因参与。*DET2* (*DEETIOLATED2*) 基因表达合成一个 5 α -还原酶 (5 α -reductase), 可以将油菜

甾醇 ((24R)-24-methylcholest-4-En-3-one) 转变为油菜甾烷醇 ((24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one)^[7-8]。拟南芥 *DET2* 基因功能缺失突变体 *det2-1* 中, 植物无法合成 BRs, 表现出植株矮小、叶色深绿、根明显缩短等表型^[9]。*DWF4* (*DWARF4*) 基因和 *BR6ox* (*BR-6-oxidase1*) 基因也被认为是 BRs 合成的关键基因, 在拟南芥突变体中具有和 *det2-1* 相似的表型^[10-11]。

杨树作为研究木本植株生长发育的模式树种, 研究 BRs 在杨树生长发育中的作用和机制对于 BRs 的研究和分子育种都有重要的理论指导意义。目前, 在杨树中过量表达 *BR6ox* 基因和 *DWF4* 基因已有报道, 均有引起杨树增高增粗等表型^[12-13]。

收稿日期: 2019-06-26 修回日期: 2019-09-11

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 2018ZX08020002-005-002

* 通讯作者: 卢孟柱, 博士, 研究员。主要研究方向: 树木性状的分子基础。E-mail: lumz@caf.ca.cn

关于杨树 *DET2* 基因功能的研究, 此前已有一些报导。邓伟等人、谭玉朋、严飞通过在杨树中异源表达棉花 *GhDET2* 基因, 分析了对杨树生长发育的影响^[14-16]。目前, 关于在杨树中过量表达其自身 *DET2* 基因的研究还未见报导, 关于过量 *DET2* 基因是否可以提高植物内源油菜素内酯的研究也未见报导。本研究从银腺杨 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*, '84K') 中分离出拟南芥 *AtDET2* 同源基因 *PagDET2*, 构建 *PagDET2* 过量表达载体, 并通过遗传转化获得过量表达 *PagDET2* 的转基因杨树, 对其生长、发育进行分析, 为研究 *DET2* 在杨树生长发育中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究使用的杨树材料均为银腺杨 84K, 为中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室保存。实验所用杨树均由组培苗扩繁而来, 并由组培苗移栽至营养土中继续培养。将带有顶端的组培苗嫩茎 (约 2.5 cm) 扦插到生根培养基 (1/2MS 基础培养基, 0.05 mg·L⁻¹ IBA 和 0.02 mg·L⁻¹ NAA, 0.5% 琼脂粉, pH 5.8~6.0), 培养于人工气候室 (温度为 23~25 °C, 光周期为 14 h/10 h 光照/黑暗, 光照强度为 50 μmol·m⁻²·s⁻¹)。生长 20 天后, 将其移栽到营养土中, 在 22 °C 长日照 (14 h/10 h 光照/黑暗) 培养室中继续培养。

本研究所使用的 Gateway 入门载体 pDNOR207、过表达载体 pMDC32、GUS 组织表达分析载体 pMDC164、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 及农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 菌种均由本实验室保存。PCR 引物合成和序列测序由

Invitrogen 公司完成。PCR 反应用的 2 倍浓度的 Premix 高保真酶 Primer STAR HS、普通扩增酶 PCR-Mix、DNA marker、胶回收试剂盒 (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit) 均为 Takara 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成及 RT-qPCR 分析 采用 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒 (RNeasy mini kit), 并按照说明书提取 RNA。RNA 浓度和质量分别用 Nanodrop8000 (Thermo Fisher Scientific) 和琼脂糖凝胶电泳检测。使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) 并按照说明书操作, 进行反转录合成 cDNA。

在 Roche 480 定量仪器, 使用 SYBR Premix ExTaq™ II 试剂盒 (TaKaRa) 上进行 RT-qPCR 分析, ACTIN 基因作为内参, 每个样品进行 4 个技术重复。

1.2.2 *PagDET2* 基因的克隆 以拟南芥 *AtDET2* 基因为目的基因, 在毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 基因组数据库 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 中 Blast 获取 *AtDET2* 同源基因 *PtDET2* (Potri.016G110600) 序列。使用引物设计软件 Primer 设计 *PtDET2* 基因蛋白质编码区 (CDS 区) 特异引物 (*PagDET2*-F 和 *PagDET2*-R) (表 1), 以 84K 杨 cDNA 为模板, 利用高保真聚合酶 Prime STAR 进行 PCR 扩增, 得到目的基因 *PagDET2*, 并进行测序验证。

1.2.3 生物信息学分析 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析 84K 杨 *DET2* 蛋白的基本理化性质。利用 NCBI 蛋白结构分析网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析 *PagDET2* 蛋白结构和功能。利用 NCBI

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR

引物名称Primer name	序列(5'→3')Sequence(5'→3')	用途Application
PagDET2-F	ATGGCCCTATTAGATCAGAGCCTCT	CDS区扩增
PagDET2-R	TCAACACAGAAAAGGGATCACTGCT	CDS sequence amplification
DET2-RT-F	ATGGCCCTATTAGATCAGAGCCT	半定量引物
DET2-RT-R	CAGGTGCGGTGGAAGTAGTGGAAGA	Primers for quantitative analysis
PtPP2A-RT-F	ACCGCATACAAGAGGTTCCACAT	定量引物
PtPP2A-RT-R	GTAACCACATTCTTTTCCTGACACC	Primers for quantitative analysis
Actin-F	AAACTGTAATGGTCTCCCTCCG	内参引物
Actin-R	GCATCATCACAACTACTCTCCGA	Internal reference primers

网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和植物基因组网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 查找获取不同物种中 *DET2* 氨基酸序列。使用 DNAMAN 软件比对不同物种中 *DET2* 蛋白氨基酸序列, 并分析保守结构域^[17]。使用软件 MEGA 6 利用 N-J 法构建不同物种的 *DET2* 蛋白序列系统发育进化树。

1.2.4 基因表达组织特异性分析 利用半定量 PCR 方法对 *DET2* 在 84K 杨各组织中的表达情况进行分析。以 84K 杨各组织的 cDNA 为模板, 用特异引物进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。根据条带亮度判断 *DET2* 基因在各组织中的表达情况。

1.2.5 载体构建及遗传转化 利用 Gateway 技术, 将 *PagDET2* 基因连接至入门载体 pDNOR207 上, 转化大肠杆菌并测序验证后, 重组至过表达载体 pMDC32 中, 转化大肠杆菌并测序验证。

将构建好的过表达载体 pMDC32-*DET2* 电击转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 利用农杆菌介导的叶盘转化法转化 84K 杨。具体遗传转化方法见文献 [18]。得到的转基因株系进行 PCR 检测, 并提取 RNA 对 *PagDET2* 基因进行 RT-qPCR 定量分析。选择表达量较高的 3 个过表达转基因株系进行试验。

1.2.6 植物体内油菜素内酯浓度测定 每个株系各选 3 株在营养土中生长 2 月的杨树苗, 取其 1 至 3 节间, 迅速放入液氮冻存, 冷冻研磨后按比例加入 PBS (磷酸缓冲液, pH 7.4)。使用植物 (Plant) 油菜素内酯 (BR) ELISA 检测试剂盒 (绿源伯德生物公司, 北京) 测定油菜素内酯含量, 每个样本进行 3 次技术重复, 并按照说明操作^[13]。

1.2.7 植物生长量及耐盐性、抗旱性研究 在不同年份不同批次分别选取野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨 #1 各 9 株, 在营养土中培养 75 天, 测量株高, 并重复 3 次。

选取野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨 #1 各 10 株, 在营养土中培养 2 个月用于耐盐性和抗旱性分析, 其中高盐实验各使用 5 株, 干旱实验各使用 5 株, 并重复 3 次。在耐盐实验中, 以 300 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液处理植物, 连续处理 10 天, 持续观察; 在抗旱实验中, 首先给予充足水分, 随后进行持续干旱处理 6 天, 持续观察。以正常浇水的植株作为对照组。过氧化氢检测使用过氧化氢检测试剂盒 (碧云天, 上海), 并按照说明书操作。

1.2.8 数据统计 使用 SPSS Statistics 24 软件进行数据统计分析, 并用 t 检验法检验差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 *PagDET2* 基因克隆和序列分析

以 84K 杨 cDNA 为模板, 使用特异引物 *PagDET2-F* 和 *PagDET2-R* 通过 PCR 扩增获得 84K 杨 *DET2* 基因编码区序列, 并命名为 *PagDET2* 基因。序列分析表明, *PagDET2* 基因与毛果杨 *PtDET2* 核酸序列相似度达 97.93%, 蛋白序列相似度达 96.89%。*PagDET2* 基因编码区全长 774 bp, 编码一个长度为 257 个氨基酸的蛋白质, 蛋白分子量约为 29.84 kDa, 理论等电点 (pI) 为 9.49。*PagDET2* 蛋白序列中含有两个 5 α -还原酶 (5 α -reductase) 必需的谷氨酸^[19], 分别为 Glu (56) 和 Glu (199)^[20-21] (图 1), 利用 NCBI 进行蛋白结构分析表明为一种固醇类还原酶 *DET2* (steroid reductase *DET2*)。

利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对分析表明, 84K 杨 *DET2* 蛋白序列与毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.)、大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) *DET2* 蛋白序列具有较高的相似度 (图 1)。一些区域存在着明显的保守序列, 可能是重要的功能结构域。

构建基于 84K 杨、毛果杨、拟南芥、水稻等植物 *DET2* 蛋白氨基酸序列的系统发育进化树 (图 2)。结果显示, *DET2* 蛋白的进化在高等植物中主要分为单子叶植物和双子叶植物两个类群。84K 杨 *DET2* 与毛果杨、拟南芥等双子叶植物 *DET2* 同属于一个系统发育分支, 亲缘关系较近, 而与水稻、玉米等单子叶植物 *DET2* 亲缘关系较远, 这与形态学分类相一致。

2.2 基因表达组织特异性分析

为了研究 *PagDET2* 基因的组织表达情况, 分别取 84K 杨根、未完全展开的嫩叶、成熟叶、中间节间和正在伸长的 1 至 3 节间提取总 RNA, 反转录后进行半定量 PCR 检测。结果表明, *PagDET2* 基因在 84K 杨各个组织中均有表达, 且在 1 至 3 节间 (In1-3)、中间节间 (S) 和嫩叶 (YL) 表达量较高, 在根 (R) 和成熟叶片 (ML) 中表达量较低。*PagDET2* 基因作为油菜素内酯合

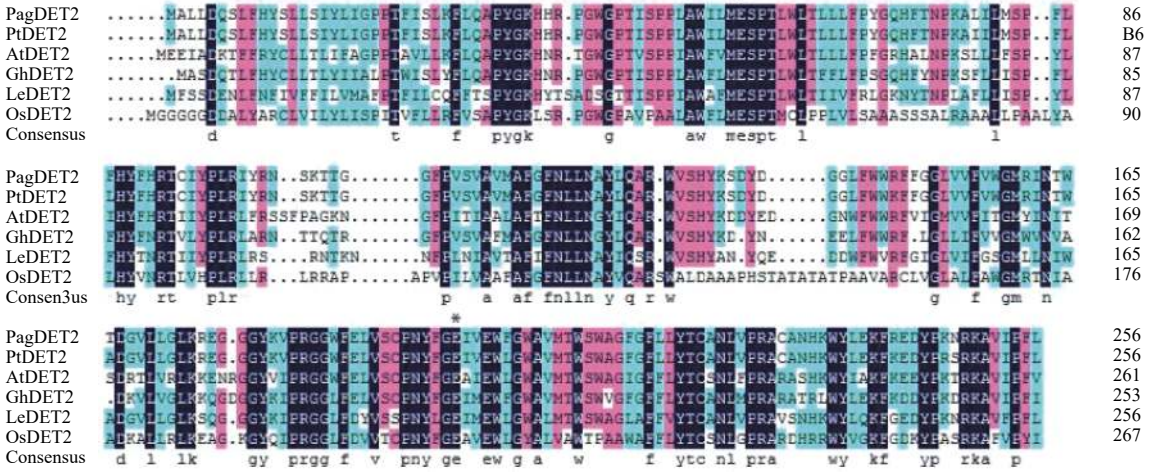


图 1 基于不同物种中 DET2 同源蛋白序列的比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of DET2 amino acid sequence in different plants

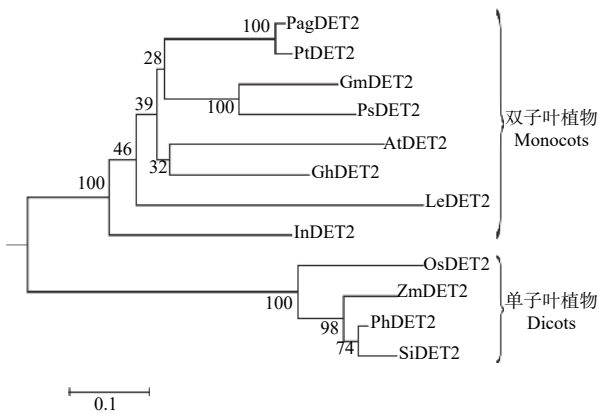


图 2 基于不同物种中 DET2 同源蛋白序列的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed on the basis of DET2 amino acid sequence

成的必须基因, 参与了植物顶端生长、叶片成熟、木材形成等生长发育过程 (图 3)。

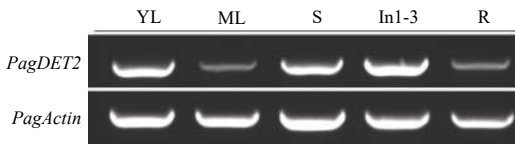


图 3 杨树中 PagDET2 基因在各组织中的表达情况 (YL: 嫩叶, ML: 成熟叶, S: 中间节间, In1-3: 1 至 3 节间, R: 根)

Fig. 3 Expression patterns of PagDET2 in poplar (YL, young leaves; ML, mature leaves; S, middle internode; In1-3, internode 1st to 3rd; R, root)

2.3 转基因杨树的转化与鉴定

为了进一步研究 PagDET2 基因在杨树生长发育中的作用, 构建了由 CaMV 35S 启动子驱动的 PagDET2 过表达载体 PagDET2-OE Vector, 采用农

杆菌侵染叶盘法, 获得了过量表达 PagDET2 基因的转基因株系 PagDET2-OE。通过 PCR 克隆和 RT-qPCR 检测后, 选取 3 个表达量较高 (图 4) 的株系 (命名为 #1、#2、#3) 进行试验。

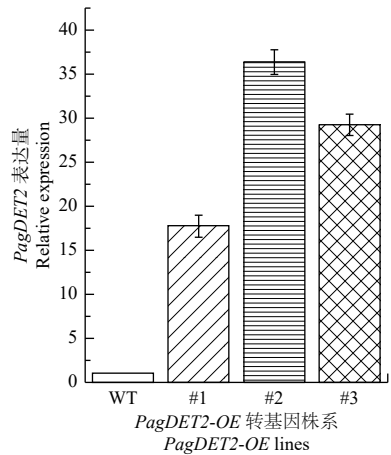


图 4 PagDET2 基因在 PagDET2-OE 转基因植株中的表达情况

Fig. 4 The expression levels of PagDET2 in PagDET2-OE lines

2.4 过表达 PagDET2 基因对杨树油菜素内酯的体内合成的影响

DET2 基因作为油菜素内酯合成过程中的关键限速基因, 为了研究 DET2 基因在杨树中的过量表达后对植物体内油菜素内酯含量的影响, 通过 RT-qPCR 检测了油菜素内酯信号通路关键基因 PtPP2A 基因在 PagDET2-OE 株系中的表达量。结果显示: PagDET2-OE 转基因杨中的 PtPP2A 基因显著高于野生型 84K (图 5)。

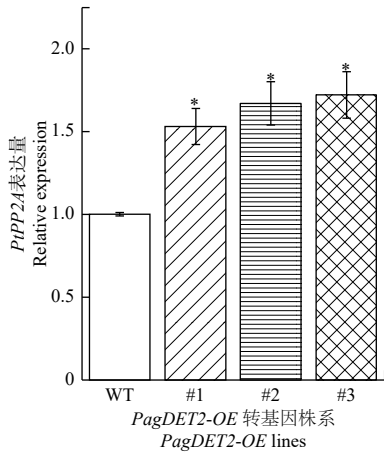


图5 *PtPP2A* 基因在 *PagDET2-OE* 转基因植株中的表达情况

Fig. 5 The expression levels of *PtEXPA8* in *PagDET2-OE* lines

进一步通过 ELISA 检测杨树体内油菜素内酯的含量, 结果显示: 与野生型 84K 杨对比, *PagDET2-OE* 株系中油菜素内酯含量显著升高 (图 6)。

2.5 过量表达 *PagDET2* 基因对杨树生长发育及抗逆的影响

在人工气候室培养室同时培养野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨, 生长 75 天的 *PagDET2-OE* 转基因杨高生长明显高于野生型 84K 杨 (图 7)。

为了研究 *PagDET2* 基因对于植物抗盐、耐旱的影响, 对野生型 84K 和 *PagDET2-OE* 转基因杨进行干旱和盐胁迫。结果显示: 在未胁迫的情况之下, 转基因杨树和野生型 84K 杨都能正常生长; 在干旱胁迫 6 天后, 野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨都出现了萎蔫、叶片卷曲、枯黄的现象, 无明显差别; 在盐处理 8 天后, 野生型 84K 杨还能正常生长, 但是 *PagDET2-OE* 转基因杨出现了焉焉、叶片卷曲、枯黄的现象 (图 8)。对野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨进行过氧化氢含量检测, 取正常生长、干旱处理 3 天和盐处理 4 天后的叶片, 液氮研磨后使用过氧化氢检测试剂盒检测其过氧化氢含量, 结果显示: 未处理时, 过氧化氢含量基本相同, 干旱处理和盐处理均会导致过氧化氢含量升高, 但是干旱处理 3 天后两者没有明显差别, 盐处理 4 天后, *PagDET2-OE* 转基因杨的叶片过氧化氢含量显著高于相同处理的野生型 84K 杨。

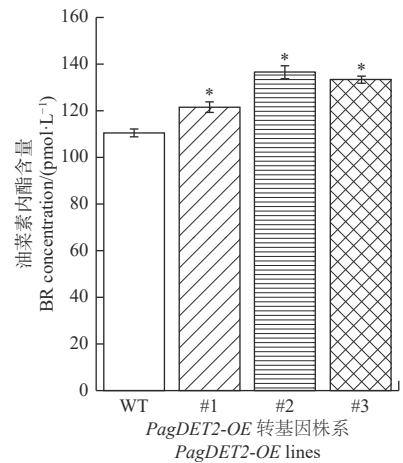


图6 *PagDET2-OE* 转基因植株中的油菜素内酯含量

Fig. 6 The content of BRs in *PagDET2-OE* lines

象, 无明显差别; 在盐处理 8 天后, 野生型 84K 杨还能正常生长, 但是 *PagDET2-OE* 转基因杨出现了焉焉、叶片卷曲、枯黄的现象 (图 8)。对野生型 84K 杨和 *PagDET2-OE* 转基因杨进行过氧化氢含量检测, 取正常生长、干旱处理 3 天和盐处理 4 天后的叶片, 液氮研磨后使用过氧化氢检测试剂盒检测其过氧化氢含量, 结果显示: 未处理时, 过氧化氢含量基本相同, 干旱处理和盐处理均会导致过氧化氢含量升高, 但是干旱处理 3 天后两者没有明显差别, 盐处理 4 天后, *PagDET2-OE* 转基因杨的叶片过氧化氢含量显著高于相同处理的野生型 84K 杨。

3 讨论

植物激素在调节植物生长发育方面具有不可替



WT

PagDET2-OE

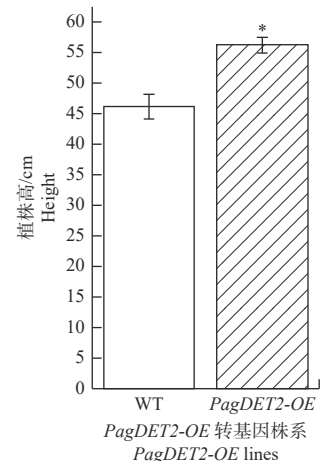


图7 野生型 84K (WT) 和 *PagDET2-OE* 转基因植株 75 天生长情况

Fig. 7 75-day-old wide type (WT) and *PagDET2-OE* transgenic poplars

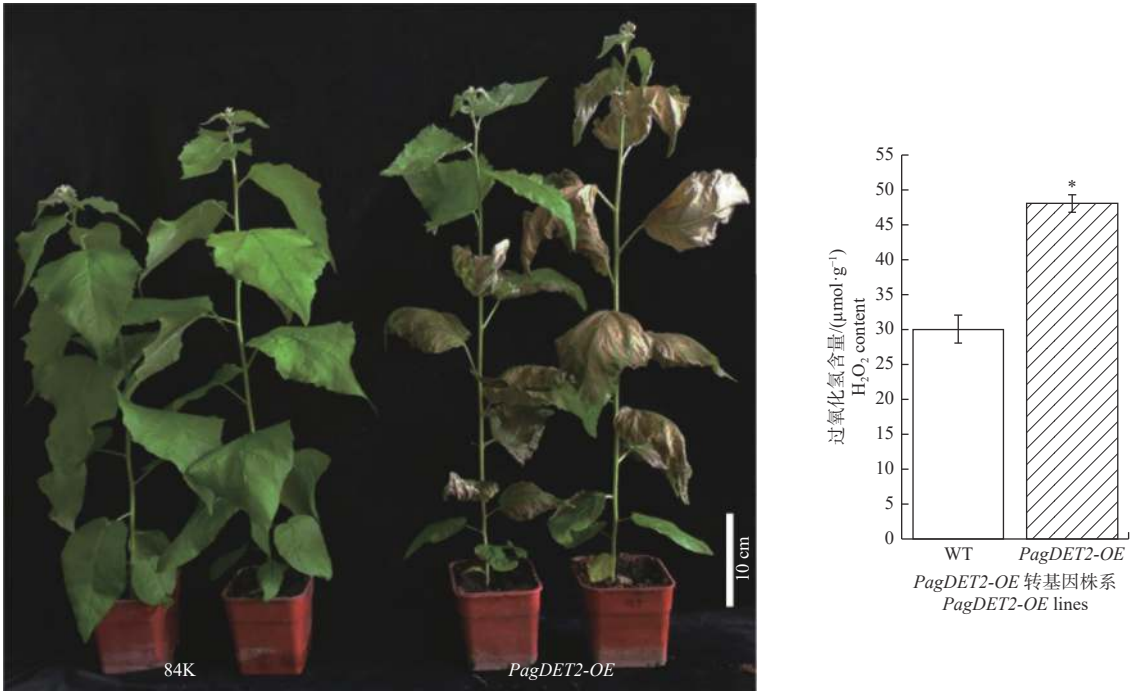


图 8 野生型 84K 和 *PagDET2-OE* 转基因植株高盐处理 8 天后的生长情况

Fig. 8 Wide type (WT) and *PagDET2-OE* transgenic poplars were treated with 300 mMNaCl for 8 days

代的作用, *DET2* 基因作为 BRs 合成过程中的关键限速基因, 对于 BRs 的合成有重要作用, 改变其在植物体内的表达, 对于研究 BRs 对于植物的功能和机制有重要意义。

基因表达模式的组织分析表明, 正在伸长生长的茎和已经完成伸长生长的茎中 *DET2* 基因均有较高的表达, 说明 *DET2* 可能影响茎的生长发育。过量表达杨树 *DET2* 有增高表型, 这一结果与在杨树中异源表达棉花 *GhDET2* 基因的结果相似^[14-16]。*PtPP2A* 是 *AtPP2A* 基因的同源基因, 有研究表明 *AtPP2A* 调控着 BRZ1 的磷酸化, BZR1 是油菜素内酯信号通路的核心, 所以 *AtPP2A* 被认为是油菜素内酯信号通路的开关, 在油菜素内酯信号传导中有重要的积极作用^[1,22]。*PagDET2-OE* 转基因杨中的 *PtPP2A* 基因显著高于野生型 84K, 说明转基因杨中油菜素内酯下游信号通路可能得到了加强。

通过 ELISA 检测植物体内 BRs 的含量表明, *PagDET2-OE* 植株中的 BRs 含量明显高于野生型。且前人研究表明拟南芥 *DET2* 基因功能缺失突变体 *det2-1* 中, 植物无法合成 BRs^[9], 说明改变 *DET2* 基因的表达量可以改变植物内源 BRs 的含量, 这对于进一步研究油菜素内酯在植物生长发育中的调控机制有重要意义。*DET2* 过量表达对于茎

生长发育和油菜素内酯信号通路基因表达量的影响可能是通过改变油菜素内酯含量实现的。这一功能与 BRs 合成的另一关键基因 *DWF4* 相似, 在杨树中过量表达 *DWF4* 基因, 可以促进杨树增高, 提高 BRs 含量^[13]。关于 *DET2* 等 BRs 合成中的关键基因的研究对利用转基因技术增加杨树生物量, 从而进行定向分子育种有潜在应用价值。

杨树中过量表达 *PagDET2* 基因可使植株对高盐的耐受性明显下降。盐处理 4 天后, *PagDET2-OE* 转基因杨的叶片过氧化氢含量显著高于相同处理的野生型 84K 杨, 这从生理上明确了高表达转基因杨树抗性降低的机制。雷雨婷等研究了过量表达杨树 *PtDET2* 基因对烟草在干旱、高盐等处理下的影响^[23], 通过在烟草中过量表达 *PtDET2* 基因, 可以提高烟草抗旱、耐盐能力。这与本研究结果有些不同, 可能是由于烟草和杨树的生长特性不同导致的。84K 杨作为木本植物速生树种, 对分水需求很大, 对高盐和干旱更敏感。本研究观察到的高生长转基因植株的抗逆性降低, 预示着培育速生林木品种需要精细的管理, 尽量避免其处于胁迫状态。

4 结论

本研究通过转基因技术, 分析了 *DET2* 基因作

为 BRs 合成的关键基因在杨树生长中的作用。结果表明,过量表达可以显著提高内源 BRs 含量,促进植株增高,对速生品种的定向培育提供了基础。但高生长植株对高盐胁迫更具有敏感性,在林木培育中应尽量避免逆境胁迫。

参考文献:

- [1] Yamamoto R, Demura T, Fukuda H. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(8): 980-983.
- [2] Clouse S D, Langford M, Memorris T C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(3): 671-678.
- [3] Khripach V A, Zhabiniskii V N, Groot A E D. Brassinosteroids: a new class of plant hormones[J]. *Plant Pathology*, 2000, 49(1): 1283-1317.
- [4] Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson K F, et al. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(2): 333-342.
- [5] Bishop G J, Nomura T, Yokota T, et al. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1761-1766.
- [6] Noguchi T, Fujioka S, Choe S, et al. Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 201-209.
- [7] Li J, Nagpal P, Vitart V, et al. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1996, 272(5260): 398-401.
- [8] Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, et al. *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-En-3-one to (24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(3): 833-839.
- [9] Chory J, Nagpal P, Peto C A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 1991, 3(5): 445-459.
- [10] Yong-Hwa C, Fujioka S, Nomura T, et al. An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation[J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(4): 609-613.
- [11] Choe S, Dilkes B P, Fujioka S, et al. The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 231-243.
- [12] Jin Y L, Tang R J, Wang H H, et al. Overexpression of *Populus trichocarpa*CYP85A3 promotes growth and biomass production in transgenic trees[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(10): 1309-1321.
- [13] Shen Y, Li Y, Xu D, et al. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid biosynthesis-related gene *PtoDWF4* from *Populus tomentosa*[J]. *Tree Physiology*, 2018, 38(9): 1424-1436.
- [14] 严飞. 棉花油菜素内酯合成酶基因(*GhDET2*)在杨树上的遗传转化及转基因植株的表型分析[D]. 昆明: 西南农业大学, 2004.
- [15] 邓伟, 吕立堂, 罗克明, 等. 油菜素内酯合成酶(Steroid 5 α -Reductase)基因的超量表达对毛白杨生长的影响[J]. *植物生理学报*, 2008, 44(3): 399-403.
- [16] 谭玉朋. 油菜素内酯合成酶基因(*DET2*)的超量表达对毛白杨生长及代谢的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [17] 王毅, 周旭, 毕玮, 等. 思茅松1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS)基因的克隆及功能分析[J]. *林业科学研究*, 2015, 28(6): 833-838.
- [18] Liu B, Wang L, Zhang J, et al. WUSCHEL-related Homeobox genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation[J]. *Bmc Genomics*, 2014, 15(1): 296.
- [19] Ming L, Xiao Y H, Xian-Bi L I, et al. GhDET2, steroid 5 α -reductase, plays an important role in cotton fiber cell initiation and elongation[J]. *Plant Journal*, 2010, 51(3): 419-430.
- [20] Russell D W, Wilson J D. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, 63(1): 25-61.
- [21] Sasse J M. Physiological actions of brassinosteroids: an update[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22(4): 276-288.
- [22] Di Rubbo S, Irani N G, Russinova E. PP2A phosphatases: the "on-off" regulatory switches of brassinosteroid signaling[J]. *Science Signaling*, 2011, 4(172): 25.
- [23] 雷雨婷, 姚新转, 吕立堂, 等. 毛白杨*PtDET2*基因的克隆及其在烟草中的抗旱与耐盐功能分析[J]. *山地农业生物学报*, 2017, 36(5): 6-13.

Cloning and Characterization of Brassinosteroid Biosynthesis-related Gene *DET2* in Poplar

LI Ze-hua¹, DU Juan², HE Xue-jiao¹, ZHAO Shu-tang¹, LIU Ying-li¹, LU Meng-zhu¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetic and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China.)

Abstract: [Objective] Brassinosteroids (BRs) as essential plant hormones play crucial roles in plant growth and development. *DET2*, a 5 α -reductase, is considered to catalyze a major rate-limiting in BRs biosynthesis. Study on *PagDET2* gene is useful to understand the role of BRs in woody plants. [Method] In this study, *PagDET2*, a homologous gene of Arabidopsis *AtDET2*, was isolated from Poplar 84K (*Populus alba* \times *P. glandulosa*, '84K'). Bioinformatic method was used to sequence alignment and analyze the basic physical, chemical characteristics and evolutionary relationship. Tissue expression patterns in poplar was analyzed by RT-PCR. The over-expression vector was constructed and transformed into poplar 84K. *PagDET2-OE* and wild-type plants were used to measure the content of BRs *in vivo* and analyze the role of *DET2* in plant growth and stresses resistance. [Result] The CDS of *PagDET2* gene was 774bp, encoding a 257 amino acid protein. The protein sequence of *PagDET2* protein were conserved among *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, rice, cotton, soybean and tomato. Tissue specific expression analysis showed that *PagDET2* was detected in root, leaf tissue and stem tissue. Stem tissue of internode 1 to 3 showed the highest expression level among these tissues. The BRs content of poplar was measured by ELISA. *DET2* could significantly increase the endogenous BRs content of poplar. Overexpression of *DET2* gene can promote plant growth and be more sensitive to salt stress. [Conclusion] Overexpression of *PagDET2* can significantly increase the endogenous BRs content and increase plant growth. *PagDET2* may also be involved in the wood formation and internode elongation.

Keywords: *DET2*; *Populus alba* \times *P. glandulosa*, '84K'; overexpression; brassinosteroid; height growth

(责任编辑: 彭南轩)