

毛竹 *PeCPD* 基因克隆与表达分析

单雪萌, 王思宁, 朱成磊, 高志民*

(国际竹藤中心竹藤资源基因科学研究所, 国家林业和草原局/北京市竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: [目的]通过对毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carri.) H. deLehaie) *CPD* 基因的分子特征和表达模式进行研究分析,为揭示 *CPD* 在参与毛竹笋生长调控、光诱导以及响应胁迫过程中的作用提供参考依据。[方法]在毛竹基因组数据库(BambooGDB)中查找 *CPD* 的同源序列,设计引物并克隆 *PeCPD*。通过生物信息学的方法分析 *PeCPD* 的基因结构、顺式调控元件、其编码蛋白的基本理化性质、保守结构域、进化关系以及该基因在不同组织中的表达模式等,利用实时定量 PCR 方法分析该基因在不同高度笋、昼夜节律光照条件下以及干旱、低温胁迫处理下叶片和根中的表达模式。[结果]获得了毛竹 *CPD* 同源基因 *PeCPD* (PH01003419G0030), cDNA 全长为 1 584 bp,包含 5'和 3'端非编码区分别为 110 bp 和 64 bp,编码区为 1 410 bp,对应的基因组长度为 2 796 bp,外显子和内含子数量分别为 6 个和 5 个。克隆获得了 *PeCPD* 编码区,与 BambooGDB 中 PH01003419G0030 序列完全一致,编码一个 470 aa 的蛋白,分子量约为 52.2 kDa,理论等电点为 9.063。同时获得了 *PeCPD* 上游序列(1 999 bp),与数据库中序列完全一致,分析发现,其中除了启动子基本元件外,还含有多种与环境相关的作用元件,如参与低温应答的 LTR、干旱响应的 MBS 和光响应元件 AE-box、TCT-motif 等。基于 *CPD* 氨基酸序列的系统进化分析表明,毛竹与水稻、玉米、谷子和二穗短柄草等单子叶植物聚类到一个大的分支,其中与二穗短柄草的亲缘关系最近。基于转录组数据的基因表达热图分析发现,*PeCPD* 在毛竹 7 个不同组织中的表达存在明显差异,其中在 20 cm 笋中的表达量最高,根中表达量最低。实时定量 PCR 分析表明,随着笋的增高,*PeCPD* 表达量呈上升趋势;在昼夜节律光照条件下,*PeCPD* 表达量随着光照时间延长而上升,随着黑暗时间延长而下降;干旱和低温胁迫条件下,叶片和根中 *PeCPD* 的表达量均呈先上升后下降的趋势。[结论]从毛竹中获得得到了 *CPD* 同源基因 *PeCPD*,该基因为组成型表达,且随着笋的增高其表达量呈上升趋势,可能通过参与 BRs 的生物合成对竹笋的生长起调控作用;*PeCPD* 在叶片中的表达呈现昼夜节律变化,表明该基因可能会参与毛竹的光形态建成;干旱和低温胁迫条件下,*PeCPD* 表达量的变化有助于提高毛竹适应逆境胁迫的能力。

关键词: 毛竹;油菜素内酯;*CPD*;基因克隆;表达分析

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)05-0058-09

油菜素内酯(BRs)是一类多羟基甾醇类化合物,是除生长素、脱落酸、细胞分裂素、赤霉素和乙烯以外的第六种植物激素,在植物中已经鉴定出了 70 多种 BR^[1-2]。BR 参与调节细胞伸长和分裂、花粉管发生、维管束分化、叶片发育、根系抑制、衰老、育性、植物对逆境的响应以及光形态发生等过程^[3-6]。持续光形态建成与矮化基因(*CPD*)是 BR 生物合成过程中的关键酶基因之一,该基因编码的蛋白具有脯氨酸富集区域、氧和血红素结合区域和 N 端膜锚

定区等细胞色素 P450 重要功能域^[7],属于细胞色素 P450 单加氧酶。目前,拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[8-9]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[10]、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[11]中的 *CPD* 基因功能与表达模式已有相关研究,拟南芥中 *AtCPD* 的表达会受到外界光照以及昼夜节律的影响^[4,12],但竹子中相关 *CPD* 基因的研究尚未报道。

竹子是禾本科竹亚科植物,具有生长速度快、竹材好、用途广等优点^[13]。竹子主要分布在低纬度的

收稿日期: 2018-10-16 修回日期: 2019-06-26

基金项目: 林业公益性行业科研专项“毛竹核心种质重测序及竹壁发育关键基因研究”(201504106);“十二五”农村领域国家科技计划项目研究任务“竹藤资源收集保存与优质基因资源筛选”(2015BAD04B0101)。

* 通讯作者:高志民,研究员,博士生导师,主要从事竹藤生长发育的分子基础研究。E-mail:gaozhimin@icbr.ac.cn

热带或亚热带地区,其生长会受到内源激素和外界环境的影响,其中,光是最重要的环境因素之一,能够控制竹子基本的生长发育过程,例如:萌发、昼夜节律和开花等。另外,低温、高温均会影响竹子的快速生长^[14-18],多种植物激素参与竹子的生长调节过程,同时也参与竹子对逆境胁迫的适应过程。本研究以毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carri.) H. deLehaie)为研究对象,从叶片中克隆 *CPD* 同源基因 *PeCPD*,并对其进行系统的生物信息学分析以及组织特异性表达分析。另外,利用实时定量 PCR 技术定量分析 *PeCPD* 在竹笋发育不同阶段以及昼夜节律光照、干旱和低温条件下的表达变化情况,以期为揭示 *PeCPD* 在毛竹中的功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

取毛竹种子(购买自广西桂林),在实验室条件下培养,土壤条件为泥炭:蛭石 = 1:1,温度控制在 25℃ 左右,光照约为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,用 1/3 B₅ 培养液培养。对 1 年生实生苗进行处理,用于进一步实验。

1.1.1 昼夜节律光照处理 选取生长良好、长势较一致的一年生毛竹实生苗,置于光照培养箱中,设定 12 h 光照($250 \sim 270 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)和 12 h 黑暗,培养 1 周后开始取样。分别在光照、黑暗 10 min 后取样,之后每隔 6 h 采集样品 1 次,光照和黑暗各采样 3 次。

1.1.2 干旱处理 用 20% 聚乙二醇(PEG6000)溶液进行浇灌,取处理 1、3、6、12 h 的叶片和根样本。

1.1.3 低温处理 将盆栽毛竹实生苗于 4℃ 条件下处理,分别取 1、3、6、12 h 的叶片和根样本。

干旱和低温胁迫处理均选择未处理实生苗叶片和根(0 h)作为对照。每个处理至少有 10 株毛竹实生苗,且每个处理 3 次重复。取上述处理的叶片和根样本于液氮中迅速淬冻并存放于 -80℃ 冰箱用于 RNA 提取。

另外,采取江西南昌野外生长的毛竹样品,选取不同发育阶段的竹笋(0.2、1.0、3.0、6.7 m),取笋中部为样品,于液氮淬冻后用干冰运回实验室,存放于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 cDNA 合成与基因组 DNA 提取

通过 Trizol 方法^[19]提取笋样品的总 RNA,按照 Promega 公司的反转录试剂盒操作说明书合成 cD-

NA,存 -20℃ 用于基因的克隆和表达模式分析。采用改良的 CTAB 法^[20]提取笋样品的基因组 DNA,用 CDS 对应的基因组序列扩增。

1.3 *PeCPD* 基因的获取与分析

在毛竹基因组数据库(BambooGDB)(<http://www.bamboogdb.org/>)^[21]中查找 *CPD* 的同源序列以及基因上游的启动子序列。根据序列利用 Primer Premier 5 分别设计扩增 CDS 序列的引物,PeCPD-F (5'-ATGGACGCGGACGCGGACGCGC-3')和 PeCPD-R (5'-GCAAATAGATTCCAATCGCTGCGTGATT-3'),以及扩增启动子序列的引物,PeCPD-pro-F (5'-TA-AAGTGCATATGCTACTGGAG-3')和 PeCPD-pro-R (5'-GTGGCTGATAAAATAACGGA-3'),由上海生工技术有限公司合成。

分别以毛竹笋 cDNA 扩增编码区,以基因组 DNA 为模板扩增对应的基因组序列。PCR 反应体系(20.0 μL):2.0 μL 5 × Primer STAR Buffer (Mg^{2+} plus),2.0 μL dNTP Mixture (2.5 mmol · L⁻¹ each),0.5 μL 上游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),0.5 μL 下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),1.0 μL cDNA (40 ng · mL⁻¹),12.8 μL ddH₂O,0.2 μL Prime STAR 酶(5 U · μL^{-1}),1.0 μL DMSO。反应程序:95℃ 预变性 4 min;按下列循环参数进行扩增反应:95℃ 1 min,60℃ 4 min,72℃ 1.5 min(cDNA)/3.0 min(基因组 DNA),经过 35 个循环后,72℃ 10 min,4℃ 保存。PCR 产物电泳分析后,用试剂盒(BIOMIGA,中国)回收目的条带,进行加 A 反应,反应体系(10.0 μL):1.0 μL 10 × PCR Buffer,1.0 μL dATP(2.5 mmol · L⁻¹),7.9 μL 胶回收产物,0.1 μL LATAq 酶。反应程序:72℃ 30 min,4℃ 保存。反应结束后按照 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的片段连接到载体上,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经抗性筛选,挑取阳性克隆并经酶切图谱分析后,交由上海生工技术有限公司测序。

借助 GSDB(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析克隆获得基因序列的结构,使用在线软件 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析目的基因上游序列中调控所含的作用元件,并用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析目的基因编码蛋白的分子量、等电点等理化性质,利用 DNAMAN 软件进行同源序列的氨基酸比对,使用 MEGA6.0 软件的邻接法构建基于毛竹和其他植物 CPD 蛋白序列的系统

发育进化树,利用毛竹共表达网络数据库 (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/bamboo/>) 对 *PeCPD* 的共表达情况进行分析。

1.4 基因表达分析

从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载前期发表的毛竹不同组织 (叶、鞭、根、20 cm 笋、50 cm 笋、早花期花序和晚花期花序) 的转录组数据 (SRX082501 ~ SRX082512) [22], 利用毛竹 *CPD* 基因的 RPKM 值表示基因的表达丰度, 利用 Matrix 2 png 绘制基因表达热图。

1.5 实时定量 PCR

根据 *PeCPD* 的 CDS 序列设计定量引物 qCPD-F (5'-GTGGTGGACCTCGGTTGTG-3') 和 qCPD-R (5'-ATTGACAGGGTATCCTTTGAGA-3')。以毛竹 PeNTB (PeNTB-F: 5'-TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG-3', PeNTB-R: 5'-AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT-3') [23] 作为内参基因, 分别以不同高度毛竹笋、不同光照处理下毛竹叶片以及干旱和低温胁迫处理下的叶片和根的 cDNA 为模板, 对 *PeCPD* 进行定量分析。采用 Roche Light Cycler R®R 480 SYBR Green I Master 试剂盒在耶拿公司 QTower 仪器上进行 qRT-PCR 实验, 反应体系 (10 μL) 为: 5.0 μL 的 2 \times SYBR Green I Mastermix, 0.8 μL cDNA, qCPD-F 和 qCPD-R 各 0.2 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加 ddH₂O 至反应总体积为 10.0 μL 。qPCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 共 40 个循环。应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法 [24] 分析实验结果。

2 结果与分析

2.1 *PeCPD* 基因序列及顺式调控元件分析

在毛竹数据库 BambooGDB 中查找得到毛竹同源基因 (PH01003419G0030), cDNA 全长为 1 584 bp, 包含 5' 和 3' 端非编码区分别为 110 bp 和 64 bp, 编码区为 1 410 bp。扩增获得的 CDS 序列、上游启动子序列以及对应的基因组序列分别为 1 410、1 999、2 796 bp, 测序获得序列与数据库中完全一致, 包含 6 个外显子和 5 个内含子 (图 1), 内含子完全符合 GT-AG 剪接原则 [25]。



图 1 *PeCPD* 基因结构

Fig. 1 Gene structural diagram of *PeCPD*

该基因编码 469 个氨基酸, 氨基酸的相对分子量为 52.2 kDa, 理论等电点为 9.063, 属于细胞色素

P450 单加氧酶家族成员, 命名为 *PeCPD*。利用 PlantCARE 在线网站分析 *PeCPD* 基因上游 1 999 kb 的启动子序列, 结果表明: 除了包含启动子基本元件外, 还含有多种与环境相关的作用元件, 如参与低温应答的 LTR、干旱响应的 MBS、赤霉素应答的元件 (GARE-motif、P-box) 以及光响应调控元件 (AE-box、TCT-motif) 等 (表 1), 推测 *PeCPD* 可能参与光响应以及非生物胁迫调控。

2.2 氨基酸序列比对与进化分析

利用 DNAMAN 同源序列比对结果显示: *PeCPD* 与单子叶植物水稻、玉米 (*Zea mays* L.)、谷子 (*Setaria italic* (L.) Beauv.)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) Roem et Schult.) 具有相似结构功能域, 均包含脯氨酸富集区域 (Proline)、氧结合区 (Domain A)、类固醇结合区 (Domain B) 和血红素结合区 (HEME-Binding) (图 2), 进而推测 *PeCPD* 编码的蛋白可能与其他单子叶植物中 CPD 具有类似的功能, 通过影响 BR 的生物合成来调控植物的生长发育。同时, 保守域也进一步佐证了 *PeCPD* 属于细胞色素 P450 家族成员。

构建基于不同物种 *CPD* 同源基因编码氨基酸序列的进化树, 结果表明: 毛竹与二穗短柄草、水稻、玉米和谷子等单子叶植物聚类到一个大的分支, 其中, 毛竹与二穗短柄草的亲缘关系较近; 而双子叶植物马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、拟南芥、大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.) 聚类到另一分支 (图 3), 这与单子叶植物和双子叶植物的进化分类关系相一致。

2.3 *PeCPD* 共表达网络分析

对与 *PeCPD* 共表达的基因分析结果表明: *PeCPD* 与 Myb 结构域蛋白 33 (PH01000029G1950)、FAD/NAD (P) 结合氧化还原酶家族蛋白 (PH01003417G0090)、类 LSD1 转录因子 (PH01001063G0080)、FAD/NAD (P) 结合氧化还原酶家族蛋白 (PH01003417G0070)、网状蛋白家族蛋白 (PH01000581G0290)、NRAMP 金属离子转运蛋白 6 (PH01006209G0030)、组蛋白超家族蛋白 (PH01000016G1090) 和 PH01004334G0050 等 8 个基因呈现正向共表达, 与 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 1 (PH01004456G0020)、甲基-CPG 结合结构域 9 (PH01002436G0190)、DNA J 热休克 N 末端结构域蛋白 (PH01000002G3050)、海藻糖磷酸合成酶 (PH01002176G0130)、丙氨酸氨基转移酶 2

(PH01000799G0060)、推定的核酸内切酶或糖基水解酶(PH01003187G0090)和 PH01002872G0260 等 7

个基因呈现负向共表达,且能与 MAP 激酶 4 (PH01000059G0730)发生蛋白互作(图 4)。

表 1 *PeCPD* 启动子序列分析
Table 1 Analysis of *PeCPD* promoter

调控元件 Regulatory element	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	功能 Function	数量/个 Number	所在链 Strand	位置 Position
CAAT-box	CAAT	启动子和增强子区常见的顺式作用元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions	31	+ -	23,109,116,147,175,183,248,367、 392,394,450,596,621,842,944、 946,958,1130,1149,1150,1152、 1163,1197,1285,1339,1342、 1480,1599,1695,1938,1940
TATA-box	TATA TATAA TATAAA TATACA TATAAT ATATAA ATATAT TATAAAT TATAAAA TACAAAA TAAAGATT ccTATAAAaa	上游 30 bp 转录起始区的核心启动子元件 Core promoter element around - 30 bp of transcription start	34	+ -	149,1728,1639,1852,217,1793、 1605,1958,411,412,413,414,415、 496,497,522,523,524,695,696、 991,992,1369,1371,1415,1430、 1431,1432,1433,1446,1448、 1547,1603,1604
LTR	CCGAAA	参与低温应答的顺式作用元件 Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness	1	+	1899
MBS	CAACTG	涉及干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought- induction	1	+	1768
TC-rich repeats	AAC ATTCTCT	参与防御和压力反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness	2	+	558,1783
ARE	AAACCA	厌氧诱导必要的顺式作用元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	2	+, -	338,1961
GCN4-motif	TGACTCA	参与胚乳表达的顺式作用元件 Cis-regulatory element involved in endosperm expression	1	-	1068
GARE-motif	TCTGTTG	赤霉素应答元件 Gibberellin-responsive element	2	-	300,1267
P-box	CCTTTTG	赤霉素应答元件 Gibberellin-responsive element	1	+	1402
AE-box	AGAAACTT	光应答的组件 Part of a module for light response	3	+, -	44,1521,719
TCT-motif	TCTTAC	部分光应答元件 Part of a light responsive element	2	+	797,1700

注 + :正链;-:负链。Notes: + : Sense strand; - : Antisense strand.

2.4 基于转录组数据的 *PeCPD* 基因表达分析

利用前期获得的毛竹转录组数据,对 *PeCPD* 的表达模式进行分析研究。从基因的表达谱热图明显可以看出,*PeCPD* 在叶、鞭、根、20 cm 笋、50 cm 笋、早花期花序和晚花期花序等毛竹 7 个组织中均有表

达,但表达丰度存在着一定的差异,其中鞭、笋和早花期花序中的表达量较高,以 20 cm 笋中最高,而根中的表达量最低(图 5)。*PeCPD* 在不同组织中和发育不同阶段的表达差异,表明在毛竹的发育过程中 *PeCPD* 的功能存在着一定的差异。

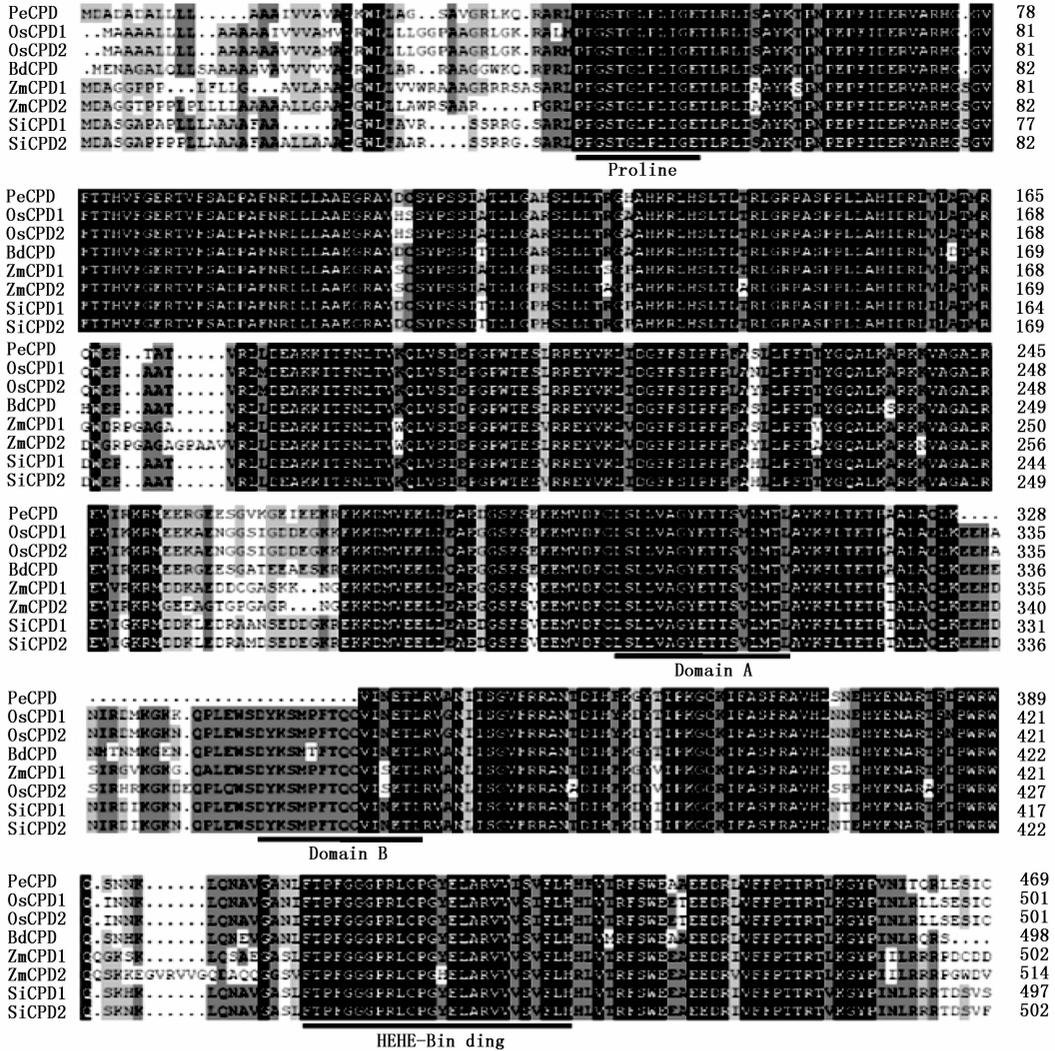


图2 基于不同物种中CPD序列的比对分析
Fig. 2 Alignment of CPD sequences in different plants

2.5 PeCPD 基因的定量表达分析

基于转录组数据的基因表达模式分析表明: PeCPD 在笋中的表达量最高,因此,以不同高度笋为材料,应用 qRT-PCR 方法对 PeCPD 的表达进行定量分析。结果显示:随着毛竹笋高度的增加,PeCPD 的表达量总体呈现升高的趋势,其中,笋高度从 1.0 m 增加到 3.0 m 的区间基因表达量变化最大,在 3.0 m 高笋中 PeCPD 的表达量约为 1.0 m 高笋中的 2 倍,而表达量在 0.2 m 到 1.0 m 之间以及 3.0 m 到 6.7 m 之间的升高趋势不明显(图 6)。

在昼夜节律光照条件下,毛竹叶片中 PeCPD 的表达模式呈现节律变化,总体表现为光照条件下(1、2、3)的表达量高于黑暗(4、5、6)条件。随着光照时间的延长,PeCPD 表达量呈现上升趋势,约在光照 12 h 后达到最大值,约为光照开始时(10 min)的 4.5 倍;随着黑暗条件的开始,PeCPD 的表达量急剧下降,并随着黑暗时间的延长呈现了下降的趋势,并约在 12 h 后达到最小值,约为黑暗开始(10 min)的 35%(图 7)。

注: BdCPD: 二穗短柄草(XP_010238746.1); ZmCPD1: 玉米(NP_001140596.1); ZmCPD2: 玉米(XP_020404008.1); SiCPD1: 谷子(XP_004977504.2); SiCPD2: 谷子(XP_004978643.1); OsCPD1: 水稻(XP_015616657.1); OsCPD2: 水稻(XP_015619622.1)。

Notes: BdCPD: *Brachypodium distachyon* (XP_010238746.1); ZmCPD1: *Zea mays* (NP_001140596.1); ZmCPD2: *Zea mays* (XP_020404008.1); SiCPD1: *Setaria italica* (XP_004977504.2); SiCPD2: *Setaria italica* (XP_004978643.1); OsCPD1: *Oryza sativa* (XP_015616657.1); OsCPD2: *Oryza sativa* (XP_015619622.1)。

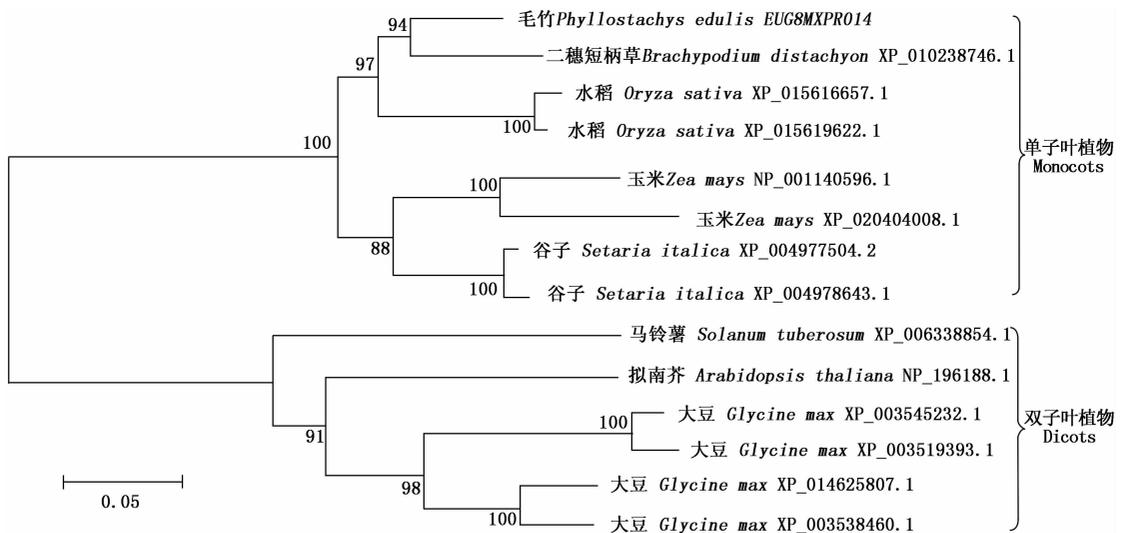
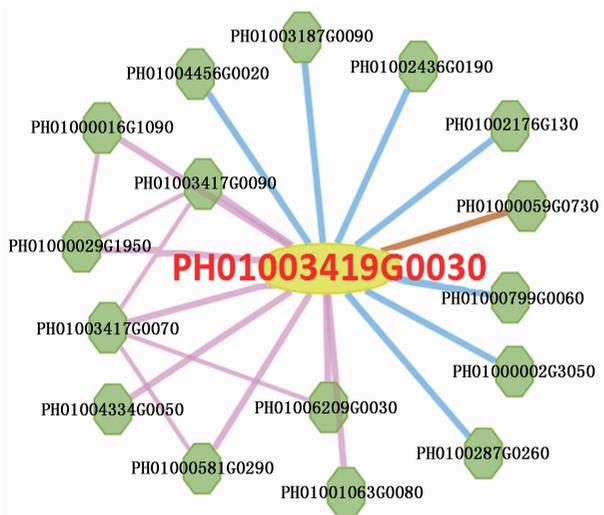


图3 基于 CPD 序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the sequences of CPD



注:粉色表示正调控;蓝色表示负调控;黄色表示蛋白互作
Notes: Pink: Positive; Blue: Negative; Yellow: Predicted protein-protein interaction

图4 *PeCPD* 基因共表达网络Fig. 4 Co-expression network of *PeCPD*

干旱胁迫条件下, *PeCPD* 在毛竹叶片和根中的表达模式均呈现先上升后下降的趋势, 分别在 3 h 和 1 h 达到最大值, 分别约为对照的 3 倍和 14 倍。在最大值之后, 叶片中 *PeCPD* 的相对表达量迅速下降, 6 h 时的表达量仅为对照的 20%, 但至 12 h 时与 6 h 时的表达量几乎没有变化; 而根中 *PeCPD* 的相对表达量则逐渐下降, 但至 12 h 时 *PeCPD* 的相对表达量仍为对照的 2 倍(图 8)。

低温胁迫条件下, *PeCPD* 在毛竹叶片和根中的相对表达量也均呈先上升后下降的趋势。根中的上升比叶片中更快, 1 h 时叶片和根中 *PeCPD* 的相对表达量分别约为对照的 1.2 倍和 2.5 倍; 但都在 3 h 时达到最大值, 分别约为对照的 5 倍和 4 倍; 之后逐渐下降, 至 12 h 时叶片中 *PeCPD* 的相对表达量约为对照的 2 倍, 而根中的相对表达量与对照的基本持平(图 9)。

3 讨论

作为限速酶基因, *CPD* 的表达量变化直接影响 BRs 的含量, 从而影响植物的生长发育。本研究从毛竹中同源克隆得到了一个细胞色素 P450 单加氧化酶基因 *PeCPD*, 氨基酸序列和系统进化树分析发现, *PeCPD* 编码蛋白与单子叶植物中的同源基因编码蛋白具有较高的相似性(85.5%), 功能结构域保守; 进化上与二穗短柄草的亲缘关系最近, 说明 *PeCPD* 在进化过程中具有高度的保守性。基因的表达是反应其在体内发挥生物学功能的表现形式之一。定量表达分析结果表明, *PeCPD* 基因在毛竹的不同组织中具有明显的表达差异, 在 20 cm 笋中的表达量最高, 早期花序和鞭中表达也很高, 而在根中的表达量最低, 表明 *PeCPD* 在毛竹不同组织的生长发育中发挥着不同的功能。同时, 本研究发现, 随着笋高度的增加, *PeCPD* 表达量呈上升的趋势, 这一期间也是笋伸长的关键时期^[26], 该基因的表达趋势变

化与笋的高度变化一致,说明其在调节笋生长过程中发挥了重要作用。

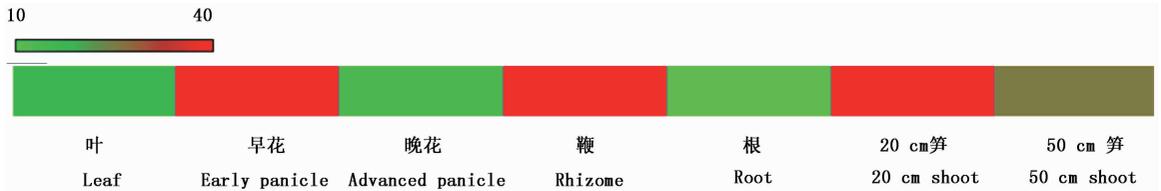


图5 *PeCPD* 基因在7个组织中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *PeCPD* in seven tissues of moso bamboo

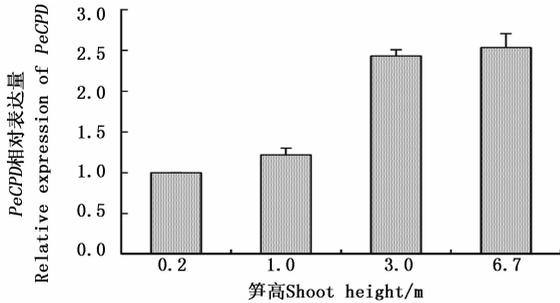
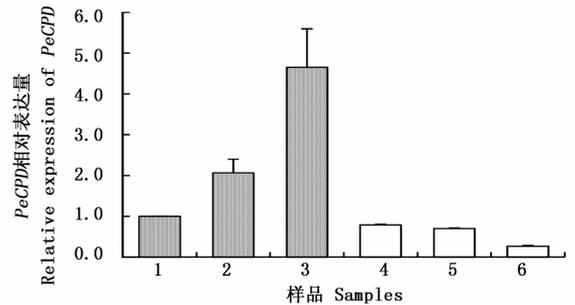


图6 不同高度笋中 *PeCPD* 的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *PeCPD* in different height moso bamboo shoots

环境是影响植物生长的重要因素。在昼夜节律光照条件下, *PeCPD* 表达量随着光照时间的增加而呈上升的趋势, 而随之进入黑暗表达量迅速下降, 且



注: 1, 2, 3 分别为光照处理 10 min、6 h、10 min、12 h 10 min 的样品; 4, 5, 6 分别为黑暗处理 10 min、6 h、10 min、12 h 10 min 的样品;
Notes: 1, 2, 3: Samples collected after light treatment for 10 min, 6 h and 10 min, and 12 h and 10 min; 4, 5, 6: Samples collected after dark treatment for 10 min, 6 h and 10 min, and 12 h and 10 min.

图7 昼夜节律光照下毛竹叶片中 *PeCPD* 的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *PeCPD* in moso bamboo leaves under circadian light

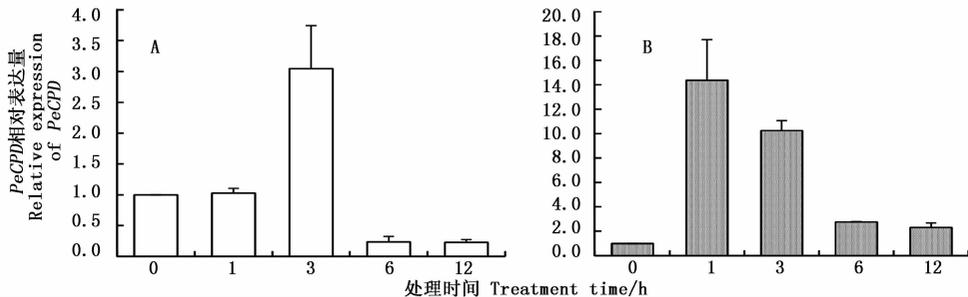


图8 干旱胁迫条件下 *PeCPD* 在毛竹叶片 (A) 和根 (B) 中的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *PeCPD* in moso bamboo leaves (A) and roots (B) under drought stress

随着黑暗时间的延长仍然呈现继续下降的趋势, 说明 *PeCPD* 的表达明显受到昼夜节律光照的影响, 这与拟南芥光周期调控下 *CPD* 基因的表达量变化相一致^[12]。在干旱和低温胁迫条件下, 叶片和根中的 *PeCPD* 表达量均呈先上升后下降的趋势, 这可能是在处理初期毛竹通过提高 *PeCPD* 的表达量来响应胁迫, 随着时间的推移植物通过调节自身的代谢来

适应胁迫的环境, 但干旱和低温胁迫条件下叶片和根中 *PeCPD* 的表达随时间的变化及达到最大值的时间表明, *PeCPD* 对干旱胁迫更敏感。BRs 对植物生长发育的调控是一个复杂的网络, 涉及 BRs 的合成与信号转导。 *PeCPD* 是 BRs 生物合成中的关键酶基因, 其功能的发挥除受到环境的影响外, 内在的调控同样是一个复杂的网络。共表达分析结果表明,

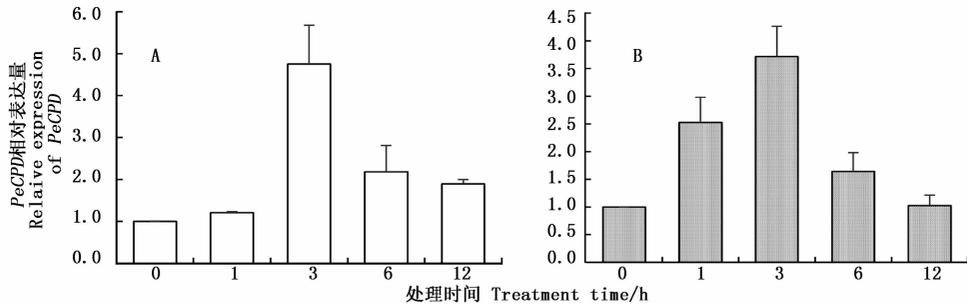


图9 低温胁迫条件下 *PeCPD* 在毛竹叶片 (A) 和根 (B) 中的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *PeCPD* in mosobamboo leaves (A) and roots (B) under cold stress

PeCPD 与多种类型的基因呈现正向和负向共表达,进一步说明 *PeCPD* 是和其它基因一起共同发挥着生物学功能,但具体情况和之间的作用机制均需要进一步实验验证。

4 结论

本研究从毛竹中获得了1个细胞色素P450单加氧酶基因成员 *PeCPD*,该基因是BRs合成通路基因,在毛竹中呈组成型表达模式,其在笋中的表达变化、随昼夜节律光照的变化以及干旱和低温胁迫条件下的变化,表明该基因可能参与毛竹的光形态建成,并在适应逆境胁迫中具有重要作用。

参考文献:

[1] Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 100(3): 710-750.

[2] Bajguz A. Metabolism of brassinosteroids in plants[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2007, 45(2): 95-107.

[3] Mandava N B. Plant growth-promoting brassinosteroids [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1988, 39(1): 23-52.

[4] Szekeres M, Nemeth K, Konczalman Z, et al. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1996, 85(2): 171-182.

[5] Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22(4): 289-297.

[6] Divi U K, Rahman T, Krishna P, et al. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 151-160.

[7] Nehert D W, Gonzalez F J. P450 genes: Structure, evolution, and regulation[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, 56(1): 945-993.

[8] Mathur J, Molnár G, Fujioka S, et al. Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids[J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(5): 593-602.

[9] Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, et al. *CYP90A1/CPD*, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(37):

31551-31560.

[10] Sakamoto T, Matsuoka M. Characterization of constitutive photomorphogenesis and dwarfism homologs in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2006, 25(3): 245-251.

[11] Koka C V, Cerny R E, Gardner R G, et al. A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(1): 85-98.

[12] Bancos S, Szatmári A, Castle J, et al. Diurnal regulation of the brassinosteroid-biosynthetic *CPD* gene in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(1): 299-309.

[13] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002: 3-10.

[14] 徐丽君, 包刚, 刘清平, 等. 曙籐竹自然降温过程中生理特性的变化[J]. *世界竹藤通讯*, 2015, 13(4): 5-9.

[15] 裴晶晶, 施拥军. 高温干旱下毛竹林受灾状况和自恢复能力研究[J]. *世界竹藤通讯*, 2017, 15(3): 31-36.

[16] 胡尚连, 卢学琴, 陈其兵, 等. 四川雅安地区2种大型丛生竹耐低温能力[J]. *竹子研究汇刊*, 2011, 30(2): 43-47.

[17] 刘济明, 李鹏, 廖小锋, 等. 干旱胁迫对小蓬竹生理化特性的影响[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(9): 153-157.

[18] 应叶青, 郭璟, 魏建芬, 等. 干旱胁迫对毛竹幼苗生理特性的影响[J]. *生态学杂志*, 2011, 30(2): 262-266.

[19] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. *Chinese Forestry Science and Technology*, 2006, 5(3): 52-54.

[20] 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.

[21] Zhao H, Peng Z, Fei B, et al. BambooGDB: a bamboo genome database with functional annotation and an analysis platform[J]. *Database (Oxford)*, 2014, 2014(10): bau006.

[22] Peng Z H, Lu Y, Li L B, et al. The draft genome of the fast growing non-timber forest species mosobamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(4): 456-461.

[23] Fan C, Ma J, Guo Q, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.

[24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[25] 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*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993: 303-357.

[26] 崔凯, 何彩云, 张建国, 等. 毛竹茎秆组织速生的时空发育特征[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(4): 425-431.

Cloning and Expression Analysis of *PeCPD* in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*)

SHAN Xue-meng, WANG Si-ning, ZHU Cheng-lei, GAO Zhi-min

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

Abstract: [**Objective**] To study the molecular characteristics and expression pattern of constitutive photomorphogenesis and dwarf of *Phyllostachys edulis* (*PeCPD*), a kind of the key rate-limiting enzymes in biosynthesis of brassinosteroids, aiming at revealing the role of *PeCPD* in regulating the rapid growth of bamboo shoots and the response to light induction and stresses. [**Method**] Primers were designed based on the *CPD* homologous sequence of PH01003419G0030 in the Bamboo Genome Database (BambooGDB) and used for *PeCPD* cloning. The bioinformatics method was used for further analyses, including the gene structure, the cis-elements, the basic physicochemical properties and the conserved domains of the protein encoded by *PeCPD*, the evolutionary relationships, and the gene expression patterns in different tissues. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method was used to analyze the gene expression in different height shoots and that in leaves and roots under the circadian rhythm light conditions and stresses of drought and cold. [**Result**] *PeCPD*, a homologous gene of *CPD* in *Ph. edulis* was obtained, which cDNA was 1 584 bp in full-length including 5' untranslated region (UTR) 110 bp, 3'UTR 64 bp and coding sequence (CDS) 1 410 bp. The corresponding genomic sequence to the CDS was 2 796 bp containing 6 exons and 5 introns. *PeCPD* encoded a 470 aa protein with a molecular weight of approximately 52.2 kDa and the theoretical isoelectric point of 9.063. At the same time, the upstream sequence of *PeCPD* (1 999 bp) was obtained, which was completely consistent with the sequence in the database. Besides the basic elements of the promoter, the upstream sequence of *PeCPD* also contained a variety of environmentally relevant action elements, such as LTR involved in low temperature response, MBS in response to drought, and light responsive elements (AE-box and TCT-motif). Phylogenetic analysis based on the CPD amino acid sequences showed that *Ph. edulis* was clustered together with the monocotyledon plants such as *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Setaria italica* and *Brachypodium distachyon*, which was closed to *B. distachyon*. Expression pattern analysis based on the transcriptome data demonstrated that *PeCPD* expressed obviously different in the seven tissues of *Ph. edulis*, with the highest level in 20 cm shoot and the lowest in root. The result of qRT-PCR showed that the expression level of *PeCPD* in shoots increased with the increasing height of bamboo shoots, those in leaves under the circadian rhythm light conditions demonstrated an increasing trend in the daytime and a decreasing trend at night (darkness). Under both drought and cold stresses, the expression of *PeCPD* in leaves and roots all showed similar trends of rising at first and falling then. [**Conclusion**] CPD homologous gene (*PeCPD*) is obtained from *Ph. edulis*. The *PeCPD* is constitutively expressed in *Ph. edulis*. Moreover, its expression level in shoots increases with the increasing height of bamboo shoots, which suggests that *PeCPD* may regulate the growth of bamboo shoots by participating in the biosynthesis process of brassinosteroids. The expression of *PeCPD* in leaves shows circadian rhythm changes, indicating that it may be involved in the photomorphogenesis of *Ph. edulis*. The expression changes of *PeCPD* under drought and low temperature stresses indicate that *PeCPD* is helpful to improve the ability of bamboo to adapt to stresses.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; brassinosteroids; *PeCPD*; gene cloning; expression analysis

(责任编辑:张 研)