

毛竹茎秆伸长过程中赤霉素生物合成、降解和信号转导关键基因的鉴定及表达分析

叶家其¹, 张毓婷¹, 傅鹰¹, 周明兵^{1,2}, 汤定钦¹

1 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300

2 浙江农林大学 浙江省竹资源与高效利用协同创新中心, 浙江 杭州 311300

叶家其, 张毓婷, 傅鹰, 等. 毛竹茎秆伸长过程中赤霉素生物合成、降解和信号转导关键基因的鉴定及表达分析. 生物工程学报, 2019, 35(4): 647–666.

Ye JQ, Zhang YT, Fu Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of gibberellin biosynthesis, metabolism and signaling family genes in *Phyllostachys edulis*. Chin J Biotech, 2019, 35(4): 647–666.

摘 要: 赤霉素 (Gibberellin) 是一类非常重要的植物激素, 在高等植物生命活动的整个周期都起着重要的调控作用。从毛竹 *Phyllostachys edulis* 基因组中共鉴定出 23 个赤霉素途径基因, 包括赤霉素生物合成相关的 8 个 *GA20ox* 和 1 个 *GA3ox* 基因、降解相关的 8 个 *GA2ox* 基因、参与赤霉素感知的 2 个 *GID1* 基因以及信号转导的 2 个 *GID2* 基因和 2 个 *DELLA* 基因。拟南芥、水稻和毛竹的系统进化树和保守基序分析显示赤霉素的合成代谢与信号转导在这些物种中是高度保守的。利用外源赤霉素处理毛竹种子和幼苗, 发现赤霉素能显著提高种子的萌发率和幼苗的茎秆伸长, 并且有着最佳的作用浓度。在 GA_3 处理后, 毛竹体内赤霉素生物合成基因 *GA20ox* 和 *GA3ox* 表达量均下调而降解活性赤霉素的 *GA2ox* 基因表达量上调; 赤霉素受体 *GID1* 和正调控基因 *GID2* 的转录水平显著提高而负调控基因 *DELLA* 的表达受到抑制。这些基因在竹笋茎秆的不同形态学位置表达差异明显, 大部分赤霉素生物合成与降解的相关基因 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 以及赤霉素受体 *GID1* 和正调控基因 *GID2* 都在竹笋的形态学上端大量表达, 而赤霉素信号转导的阻遏基因 *DELLA* 在笋体形态学底端大量积累而顶端基本不表达。

关键词: 毛竹, 赤霉素, 生物合成, 代谢, 信号转导, 基因表达

Received: October 15, 2018; **Accepted:** January 14, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31500542, 31870656, 31470615), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. 2016C02056-8).

Corresponding authors: Mingbing Zhou. Tel: +86-571-63743869; E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

Dingqin Tang. Tel: +86-571-63748811; E-mail: tang@zafu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31500542, 31870656, 31470615), 浙江自然科学基金 (No. 2016C02056-8) 资助。

网络出版时间: 2019-02-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190212.1446.001.html>

Genome-wide identification and expression analysis of gibberellin biosynthesis, metabolism and signaling family genes in *Phyllostachys edulis*

Jiaqi Ye¹, Yuting Zhang¹, Ying Fu¹, Mingbing Zhou^{1,2}, and Dingqin Tang¹

¹ State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

² Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center for Bamboo Resources and High-Efficiency Utilization, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

Abstract: Gibberellin is an essential plant hormone that plays an important regulatory role throughout the life cycle of higher plants. A total of 23 genes involved in gibberellin action were identified from *Phyllostachys edulis* genome, including 8 *GA20ox* and 1 *GA3ox* genes involved in the gibberellin biosynthesis, 8 *GA2ox* genes involved in the metabolism of gibberellin, 2 *GID1* genes involved in gibberellin perception, 2 *GID2* genes and 2 *DELLA* genes involved in gibberellin signal transduction. Phylogenetic analysis of these genes from *Arabidopsis*, *Oryza sativa* and *Phyllostachys edulis* revealed that gibberellin biosynthesis, metabolism, and signaling pathways are conserved in these species. Treatment of seeds and seedlings of bamboo with exogenous gibberellin revealed that gibberellin significantly increased seed germination rate and stem elongation of seedlings, and had the best concentration of action. The expression levels of *GA20ox* and *GA3ox* genes in the bamboo seedlings were down-regulated and the expression of the active gibberellin-degrading gene *GA2ox* was up-regulated after GA₃ treatment, and the transcriptional level of the gibberellin receptor *GID1* and the positive regulatory gene *GID2* was significantly increased while the expression of the negative regulatory gene *DELLA* was decreased. These genes have significant differences in the expression of different spatial locations of bamboo shoot stems, *GA20ox*, *GA3ox*, *GA2ox*, *GID1* and *GID2* are all expressed in the upper part of bamboo shoots, while the repressor gene *DELLA* accumulates at the bottom of the shoots and is hardly expressed at the top.

Keywords: *Phyllostachys edulis*, gibberellin, biosynthesis, metabolism, signal transduction, gene expression

植物激素作为植物体内广泛存在的一类痕量信号分子, 对于调节植物的各种生长发育过程和环境应答具有非常重要的作用^[1]。赤霉素(Gibberellin, GA)是调控植物体生长发育必不可少的一类植物激素, 最早发现于水稻的“恶苗病”, 患病水稻体内赤霉素过表达并且会出现疯长的现象^[2]。目前已经鉴定的赤霉素有 136 种, 按照它们被发现的顺序依次命名为 GA₁、GA₂、GA₃、GA₄ 等^[3-4], 但其中只有 GA₁、GA₃、GA₄ 和 GA₇ 具有生物活性, 其余均为 GAs 分子的代谢物和中间产物^[5]。赤霉素在植物生长发育的各个阶段都发挥着重要作用, 它参与调控植物生长发育的各种生理过程: 如打破种子休眠并促进其萌发、植物生长、开花和果实发育等。其中最显著的作用是促进节间的伸长, 从而促进植物的生长^[6-7]。赤

霉素作用可以通过不同的途径实现, 主要包括赤霉素的合成代谢和极性运输, 以及赤霉素信号途径, 包括受体感知和信号转导。

赤霉素的主要合成部位为植株的幼嫩组织, 如根尖、茎尖以及生长中的果实和种子等^[8]。在高等植物中, 根据赤霉素合成途径的亚细胞区域和该途径中所参与的酶的种类, 赤霉素的生物合成分为 3 个阶段: 1) 在质体中, 4 个类异戊二烯形成一个 C₂₀ 的线性分子, 牻牛儿苗牻牛儿苗焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGDP) 环化成赤霉素的前体——内根-贝壳杉烯酸 (Ent-kaurenoic acid); 2) 在质体折叠区和内质网中, 内根-贝壳杉烯酸逐渐转变为第一种形式的 GA——GA₁₂; 3) 在细胞溶质中, GA₁₂ 先转变为 C₂₀-GA, 然后转变为 C₁₉-GA, 包括有活性的赤霉素。赤霉素的生

物合成过程需要多种酶的参与,主要包括柯巴焦磷酸合酶 (Ent-copalyl diphosphate synthase, CPS)、内根-贝壳杉烯合成酶 (Ent-kaurene synthase, KS)、内根-贝壳杉烯氧化酶 (Ent-kaurene oxidase, KO)、GA20-氧化酶 (GA20-oxidase, GA20ox)、GA3-氧化酶 (GA3-oxidase, GA3ox) 和 GA2-氧化酶 (GA2-oxidase, GA2ox) 等^[8-9]。尽管赤霉素代谢途径早期代谢通量较大,但赤霉素后期的代谢酶 (GA20ox、GA3ox、GA2ox) 对活性 GA 的精确调控具有关键作用^[10]。活性赤霉素前体的合成过程都需要 GA20ox 的参与;GA20ox 催化合成具有生物活性的赤霉素的倒数第二步,可以将 GA₁₂ 和 GA₅₃ (C₂₀ 类赤霉素) 转化为 GA₉ 和 GA₂₀ (C₁₉ 类赤霉素)^[11]。GA3ox 是赤霉素合成途径中最后一步的关键酶,进而将 GA₉ 和 GA₂₀ 催化合成成为具有生物活性的 GA₁ 和 GA₄^[12]。GA2ox 是植物体内赤霉素降解过程的关键酶,它可以将具有生物活性的 GA₁ 和 GA₄ 分别转化为无活性的 GA₈ 和 GA₃₄,进而维持植物体内具有生物活性的 GAs 与其中间产物之间的动态平衡^[13]。GA20ox 和 GA3ox 的缺少,会导致合成有生物活性赤霉素的量减少;而过表达的 GA2ox 则会降解植物体内生物活性的赤霉素^[14]。

植物体内 GAs 平衡的调控过程,信号通路同样发挥着重要的作用。赤霉素信号感知是植物体将细胞外赤霉素信号传入细胞内的过程。赤霉素 GA 信号可以被赤霉素受体 GID1(Gibberellin insensitive dwarf1)感知到,当 GID1 感知到 GA 信号后,能够激活信号通路,从而调控下游基因的表达,进而影响植物的生长发育和形态建成。赤霉素信号转导的基因路径是 GA-GID1-DELLA 信号通路,组分包括赤霉素受体 GID1、DELLA 蛋白家族成员(DELLAs)以及与 DELLA 蛋白降解有关的带有 F-Box 基序的同源蛋白^[15]。GA 的信号转导是通过降解 DELLA 蛋白来实现的。当 GA 处于低水平时,GID1 不与 GA 结合,使 DELLA 蛋

白与赤霉素应答基因结合并抑制其活性,进而阻遏植物的生长;当赤霉素处于高水平时,GID1 可感知 GA 信号并与之结合形成 GA-GID1,然后结合到 DELLA 蛋白中形成 GID1-GA-DELLA 复合三聚体^[16]。当形成 GA-GID1-DELLA 复合体时,F-Box 蛋白中的泛素连接酶 SCF 能结合到 DELLA 蛋白的 GRAS 区域,通过泛素蛋白体通道迅速降解 DELLA 蛋白,导致其阻遏作用被解除,植物体表现出正常的赤霉素反应^[15]。

近年来,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[17]、水稻 *Oryza sativa*^[18]、南瓜 *Cucurbita moschata*^[19]、玉米 *Zea mays*^[20]、大麦 *Hordeum vulgare*^[21]、苹果 *Malus pumila*^[22]、小桐子 *Jatropha curcas*^[10] 等多种植物中,赤霉素合成、降解与信号转导的基因家族已经被大量鉴定和克隆。而对于多年生木本植物毛竹 *Phyllostachys edulis*,这方面的研究还甚少。毛竹作为世界上最重要的非木材林产品之一,以其茎秆的快速拔节生长而备受关注^[23]。目前毛竹高生长的机制尚未完全了解,许多研究者认为植物内源激素,特别是生长素和赤霉素,在调节毛竹节间细胞伸长方面发挥着重要的作用^[24]。在毛竹茎秆生长的过程中,赤霉素含量的动态变化与竹笋的快速生长有着密切的联系,毛竹笋生长初期,GA₃ 含量较低;而到了毛竹快速生长阶段,GA₃ 的含量急剧上升到了一个峰值^[24]。因此,了解毛竹中赤霉素合成代谢途径与信号转导途径关键基因可以从分子水平上更深刻地理解赤霉素与毛竹快速伸长的作用机制。同时,毛竹的基因组序列已经被发布^[25],为进行赤霉素基因家族相关基因全面分析提供了一个绝佳的机会。本研究对赤霉素的合成代谢以及信号转导相关基因进行鉴定,比较了毛竹与水稻和拟南芥在赤霉素合成代谢与信号转导相关基因的进化关系;通过实时荧光定量 PCR 检测了这些基因在外施赤霉素的毛竹实生苗和毛竹笋不同部位的表达特征,为深入探讨赤霉素调控竹子生长发育的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毛竹赤霉素生物合成与代谢及信号转导相关基因的数据获取及进化分析

1.1.1 同源基因的数据获取

从毛竹基因组数据库(BambooGDB, <http://www.bamboogdb.org/>)下载毛竹的基因注释和基因组序列。为了鉴定毛竹赤霉素途径中涉及的基因家族,从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、拟南芥信息资源(TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>)、水稻基因数据库(RiceData, <http://www.ricedata.cn/gene/>)和植物基因组数据库(<http://www.phytozome.net/>)中下载相应GA₃合成代谢和信号转导相关的氨基酸序列,作为BLAST软件搜索毛竹数据库的查询序列,搜索毛竹基因组数据库获得第一循环的候选基因;同时具有 $e \leq 10^{-20}$ 的和 $\text{score} \geq 100$ 的序列被用作第二循环搜索的新查询以避免丢失额外的候选基因。利用Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)和SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)两个在线网站中验证这些候选基因,E值设定为 $<e^{-15}$,其他参数为默认值;删除不含特征保守结构域的基因,通过基因注释最终确定目的基因。

1.1.2 同源基因的进化分析和基序分布

将水稻和拟南芥中已经鉴定的上述基因的蛋白序列与上述毛竹中最终确定的同源基因的蛋白序列利用ClustalX 1.81进行多重比对,参数设定为默认值,将生成的“aln.”文件导入MEGA 7.0^[26],并通过该软件中的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。采用以下参数:模式采用“Poisson model”,缺口设置“Complete deletion”,重复次数为Bootstrap=1 000次。利用MEME在线软件(<http://meme-suite.org/>)进行蛋白保守基序的分析,E值设定为 $<e^{-20}$,保守结构域最大基序数量设置为10个,其余设置为默认参数。

1.2 毛竹种子与GA₃处理

1.2.1 GA₃处理种子的萌发率

试验所使用的毛竹种子是半同胞,2017年采自广西壮族自治区灵川县大境乡同一株开花毛竹,挑选大小一致的饱满种子作为试验材料。用70%酒精消毒种子表面60 s,灭菌水冲洗3遍;再用2% NaClO溶液浸泡10 min,灭菌水冲洗3遍,用不同浓度GA₃(50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L)溶液浸种,灭菌水浸种作为对照。每组选择100颗种子,黑暗浸泡24 h后用无菌水冲洗2~3次。置于灭菌的双层滤纸上萌发,萌发环境25℃并全程黑暗处理。每天检查并记录种子萌发数量,2周后统计种子发芽率,并进行差异显著性分析。

1.2.2 幼苗生长实验

为了确定GA₃浓度对毛竹生长的影响,将毛竹种子在0、50、100、200 mg/L的赤霉素溶液中浸泡24 h并黑暗萌发2周后,每组选择萌发状态良好且一致的幼芽20颗,转移到光照培养室,培养条件为温度25℃,光周期为光照16 h、黑暗8 h。4周后测量幼苗的根、茎、叶长度并进行差异显著性分析。根长为伸直的主根长度,茎长为根部以上到最近的第一片伸展叶片之间的距离,叶长为第二片伸展叶片的长度。

1.2.3 毛竹中赤霉素作用相关的基因对GA₃的响应

在25℃培养室中16 h光照/8 h黑暗处理的条件下,在土壤中培育毛竹幼苗4周。用不同浓度的GA₃(0、50、100、200 mg/L)喷施叶片,以2 d的间隔喷施2周,在最后一次喷施后立即剪取毛竹幼苗的茎和叶组织用于下一步的RT-PCR分析;对于时间梯度的试验,4周龄幼苗用100 mg/L赤霉素喷施叶片,在不同的时间点(1、3、6、12、24 h)剪取毛竹幼苗的茎和叶组织,以4周龄喷施清水的毛竹幼苗作为对照^[27]。试验的所有材料均采用3次生物学重复,剪取的幼苗叶片立即置于液氮速冻,-80℃保存。

采用 Trizol (TaKaRa 公司) 法提取毛竹幼苗的茎和叶组织的总 RNA, 用 Prime ScriptTM RT Master Mix (TaKaRa 公司) 去除基因组 DNA 和反转录合成 cDNA。引物的设计选择在每个基因非保守区域, 扩增片段均为 150 bp 左右, PCR 检测引物特异性 (表 1)。反应体系 (10 μ L): 5 μ L SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TaKaRa 公司), 0.8 μ L cDNA, 0.4 μ L primer-F, 0.4 μ L primer-R, 3.4 μ L 无菌水。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 7 min; 预扩增 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。选取 NTB 为内参基因^[28], 以喷施清水的材料作为对照组设定为 1, 处理样品中每个基因的表达水平均以此为参照, 以 3 次生物学重复结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算相对表达量^[29], 并进行差异显著性分析。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

Primer name	Upstream primer (5'-3')	Downstream primer (5'-3')
PhGA20ox1	GATGAAGGAGCTGTCTGCTGAC	CACGGCGGGTAGTAGTTGCA
PhGA20ox2	GCGATAATGGAGGTGCTGG	GCACGGCGGGTAGTAGTTG
PhGA20ox3	ACATCCCGTCGCAGTTCAT	GCTCATCTCGCCGCAGTAG
PhGA20ox4	CGCCAAAGTGATGGAAGAGC	TGGTTCAGCCGGATGAATGT
PhGA20ox5	CCAGGTTTGGAGCAATGACA	CCCCAGTTGTAGGCGTTGTA
PhGA20ox6	AGATCAGCCTCCCCGTCAT	TGGAAGAACCCAAAGTCCC
PhGA20ox7	AGGCGATGTCATACAGGTGC	GCCGTGGATGCTGAAGAAGA
PhGA20ox8	AGAGCTACGCCGAGGGGATG	CTGGAGCACGGTGAGGAAA
PhGA3ox1	CCTCTTCCACATCCTCACCA	GCCGAGGAAGTATCCGAGTG
PhGA2ox1	ACCAGGTGTTCCGGGTGAA	GCGGAGCACGGAGATTAGC
PhGA2ox2	TCCGTGCTCCGCTCCAAC	CCACCACCCTGTGCTTCA
PhGA2ox3	CATCTCCGTGCTCAGGTCCAA	CGACGTTACGAAGAAGGATT
PhGA2ox4	AGGGGTGCGACGAGACGA	GGCAGAGCACGGTGAGGA
PhGA2ox5	GAGAAGACTGACTTGCGAGGTG	GGACGTGGTGGGTAGTGTT
PhGA2ox6	AGGGCTCAAGGACCCCAGAT	GCCTTGCTGCTGACAATGCT
PhGA2ox7	CTGCTACTTCGCCTTCCC	GAGCCGGTGGCCTTGATG
PhGA2ox8	AAGGGTTGGGCATTGAGGAG	TTCGGGACATGGTGGGTAGT
PhGID1A	CGAGGGGATCAAGATATGCG	GTCTTGAGCGTGACGAAGT
PhGID1B	AGAGCCTCATCATCGTGTCG	CTCGTGGTAGTGCTCCGTGT
PhGID2A	CGAGCCAGCCAAGAAGCAG	ACACCAGGTCCTCCCCAAG
PhGID2B	CGCTCTTCTCCATCGACTGC	TCCACGGGCTTGACAGGAA
PhSLR1	TGGTACGGACCAGGTCATGT	CCTGCTTGTTAGGCATTGGAG
PhGAI	AGGATGCTGGTCGGGTTG	CTGACACTGCCGCTGCTA
NTB	TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG	ATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT

1.3 毛竹不同节间中赤霉素相关基因的表达分析

试验所采集的毛竹笋均来自于浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室的翠竹园中, 选取当年正处茎秆快速伸长的地径接近且株高 150 cm 左右的毛竹笋 3 株作为材料重复, 以地面附近没有根的第一节定义为竹笋的第 1 节。每株笋按形态学位置自下而上分别取材第 7 节、第 15 节、第 27 节作为毛竹基部、中部和顶部的代表节间。RNA 的提取和 RT-PCR 同 1.2.3。采用均一化法比较每个基因在毛竹笋不同部位的表达量差异。将每个基因的表达量进行 Z-score 处理^[30], 使得每一个基因在所有样本的表达量都变成了均值为 0、标准差为 1 的一组值。通过在线网站 <http://www.omicshare.com/tools/> 绘制表达量热图。

2 结果与分析

2.1 毛竹基因组中赤霉素作用关键基因家族的鉴定

为了揭示赤霉素影响毛竹茎秆生长的作用,本研究搜索了毛竹全基因组,鉴定毛竹中的赤霉素关键基因。利用已知的拟南芥中 26 个 GAs 相关基因和水稻中 12 个 GAs 相关基因作为模板,经过 Blastp 检索,基于 E 值设定 $<e^{-20}$ 和去除冗余序列,最终在毛竹基因组中共确定了 23 个候选基因。其中,17 个赤霉素氧化酶类基因,包括 8 个 GA20ox 基因、1 个 GA3ox 基因和 8 个 GA2ox 基因,按照它们与水稻同源蛋白的相似性高低分别

命名为 *PhGA20ox1-8*、*PhGA3ox1* 和 *PhGA2ox1-8*; 2 个赤霉素受体基因 *GID1*, 命名为 *PhGID1A* 和 *PhGID1B*; 2 个正调控 *F-Box* 类基因, 命名为 *PhGID2A* 和 *PhGID2B*, 以及 2 个负调控 *DELLA* 类基因, 命名为 *PhSLR1* 和 *PhGAI* (表 2)。

2.1.1 赤霉素的生物合成基因

GA20ox 和 GA3ox 家族基因调控赤霉素生物合成,对植物细胞中的赤霉素积累起着关键作用。它们都是由小基因家族编码,在不同的物种中有着各自的保守基序。图 1 为 GA20ox 蛋白家族在拟南芥、水稻和毛竹的进化树,显示各个基因在这 3 个物种中都比较保守,而毛竹与同为禾本科

表 2 赤霉素相关基因的鉴定及命名

Table 2 Identification and naming of gibberellin related genes

Gene family/species	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>P. edulis</i>	Named
GA20ox	<i>AtGA20ox1</i>	<i>OsGA20ox1</i>	<i>PH01000141G0020</i>	<i>PhGA20ox1</i>
	<i>AtGA20ox2</i>	<i>OsGA20ox2</i>	<i>PH01000794G0570</i>	<i>PhGA20ox2</i>
	<i>AtGA20ox3</i>	<i>OsGA20ox3</i>	<i>PH01000535G0510</i>	<i>PhGA20ox3</i>
	<i>AtGA20ox4</i>		<i>PH01001332G0050</i>	<i>PhGA20ox4</i>
	<i>AtGA20ox5</i>		<i>PH01002631G0110</i>	<i>PhGA20ox5</i>
			<i>PH01000788G0540</i>	<i>PhGA20ox6</i>
			<i>PH01003113G0060</i>	<i>PhGA20ox7</i>
			<i>PH01001619G0150</i>	<i>PhGA20ox8</i>
GA3ox	<i>AtGA3ox1</i>			
	<i>AtGA3ox2</i>	<i>OsGA3ox1</i>		
	<i>AtGA3ox3</i>	<i>OsGA3ox2</i>	<i>PH01002274G0400</i>	<i>PhGA3ox1</i>
	<i>AtGA3ox4</i>			
GA2ox	<i>AtGA2ox1</i>	<i>OsGA2ox1</i>	<i>PH01000018G1890</i>	<i>PhGA2ox1</i>
	<i>AtGA2ox2</i>	<i>OsGA2ox2</i>	<i>PH01001124G0470</i>	<i>PhGA2ox2</i>
	<i>AtGA2ox3</i>	<i>OsGA2ox3</i>	<i>PH01001567G0040</i>	<i>PhGA2ox3</i>
	<i>AtGA2ox4</i>	<i>OsGA2ox4</i>	<i>PH01002291G0280</i>	<i>PhGA2ox4</i>
	<i>AtGA2ox6</i>		<i>PH01000273G0650</i>	<i>PhGA2ox5</i>
	<i>AtGA2ox7</i>		<i>PH01000685G0370</i>	<i>PhGA2ox6</i>
	<i>AtGA2ox8</i>		<i>PH01000604G0250</i>	<i>PhGA2ox7</i>
			<i>PH01000274G0980</i>	<i>PhGA2ox8</i>
GA receptors	<i>AtGID1A</i>	<i>OsGID1</i>	<i>PH01001316G0350</i>	<i>PhGID1A</i>
	<i>AtGID1B</i>		<i>PH01002734G0310</i>	<i>PhGID1B</i>
	<i>AtGID1C</i>			
F-Box	<i>AtSLY1</i>	<i>OsGID2</i>	<i>PH01000146G1260</i>	<i>PhGID2A</i>
	<i>AtSNE</i>		<i>PH01003003G0170</i>	<i>PhGID2B</i>
DELLA	<i>AtGAI</i>	<i>OsSLR1</i>	<i>PH01000142G0910</i>	<i>PhSLR1</i>
	<i>AtRGA</i>		<i>PH01002560G0270</i>	<i>PhGAI</i>
	<i>AtRGL1</i>			
	<i>AtRGL2</i>			
	<i>AtRGL3</i>			

的水稻亲缘关系更为接近。其中 PhGA20ox4、PhGA20ox6、PhGA20ox7、PhGA20ox8 这 4 个蛋白序列的保守性比较低,并且 MEME 的基序搜索结果显示这 4 个基因的序列长度更短并且有保守基序的缺少现象。Motif 1、Motif 2 和 Motif 9 在各个物种中高度保守,其中包含了与 GA 底物结合有关的 LPWKET 基序、H 和 D 残基等(图 1,

表 3)。

GA3ox 催化合成具有生物活性的 GA₁ 和 GA₄, 是活性赤霉素合成途径的关键一步。进化关系显示 GA3ox 在不同的物种中高度保守,毛竹的蛋白序列与拟南芥和水稻的同源蛋白的相似度分别达到了 76.77%和 81.92%, 并且它们都具有共同的保守基序(图 2, 表 4)。

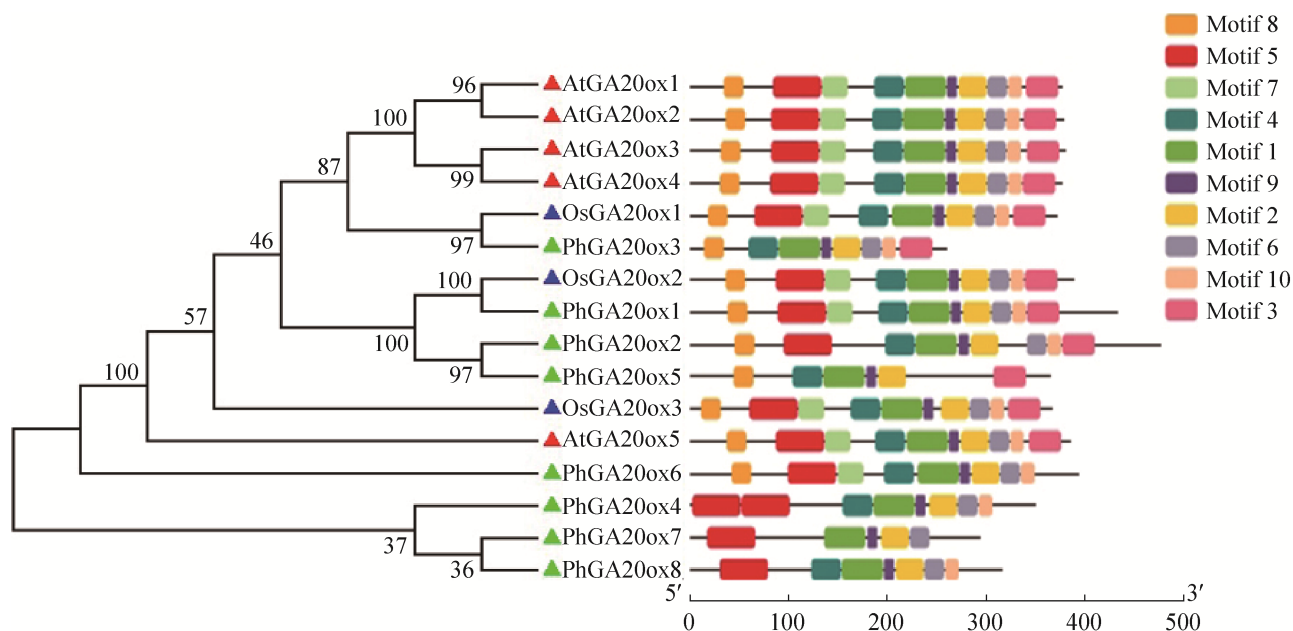


图 1 GA20ox 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 1 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of GA20ox family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

表 3 GA20ox 保守基序注释

Table 3 Motif sequences of GA20ox

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	3.4e-356	43	REFFEDNDSIMRLNYYPPCPZPELTGLTGPHCDPTSLTILHQD
Motif 2	2.8e-217	29	WRPVRPVPGAFFVNIGDTFMALSNGRYKS
Motif 3	5.2e-229	34	PRKYPDFTWAMLLEFTQRHYRADTRTLDAFSRWL
Motif 4	3.9e-169	31	VYQEYCEAMSELSLKIMELLGLSLGVGRGYY
Motif 5	2.4e-198	50	VAEACEKHGFFLVVNHGVDAALLARALELASAFFALPLAEKQRARRKPGE
Motif 6	8.4e-119	21	CLHRAVVNSERERRSLAFFLC
Motif 7	1.2e-104	27	SSGYASSFTGRFSSKLPWKETLSFRFS
Motif 8	5.5e-066	21	LLSRQPNIPAQFVWPDDEAPP
Motif 9	5.1e-044	11	DVGGLZVLVDG
Motif 10	9.8e-029	15	PRKDKVVRPPPELVD

2.1.2 赤霉素的降解基因

调控 GA 降解的关键基因家族 GA2ox 在拟南芥、水稻和毛竹中的保守性较差, 但共同含有几

个重要的保守基序, 如 Motif 1 和 Motif 6 存在于所有的基因中 (图 3, 表 5)。拟南芥 GA2ox 家族的基因普遍存在着 Motif 10 缺少现象, 而水稻的

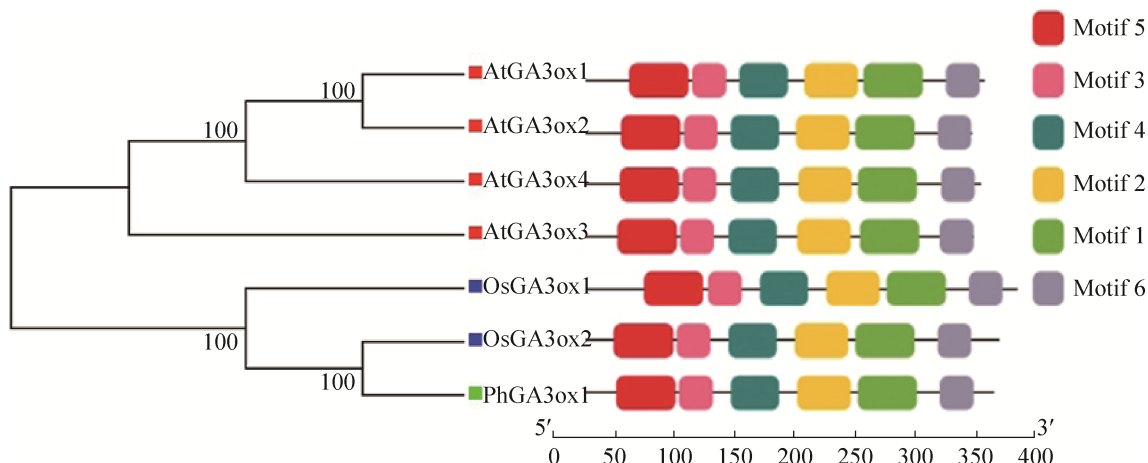


图 2 GA3ox 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 2 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of GA3ox family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

表 4 GA3ox 保守基序注释

Table 4 Motif sequences of GA3ox

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	7.6e-130	50	WVTVPVPVPGALVVNVGDLFHILTNGRFHSLVLRHRAVVRNTRDRISLAYFLG
Motif 2	2.0e-124	45	TATIHLNHYPCPEPDRAMGLAAHTDSTLLTILYQSNVPGLQVFR
Motif 3	2.0e-071	29	RSPGGVSGYGVPRISFFNKKMWSEGFTF
Motif 4	4.0e-068	21	LWPDHHLKFCDIMEEYEEEMRKLADKLLWFLGSLGLTEED
Motif 5	1.3e-068	50	DPDAAALVGHAAETWGAFAQJAGHGVPAALLADVEELTARLFALPAQRKLR
Motif 6	1.2e-048	29	SPLYRAVTWPEYLAVKAKHFNKALSAJRM

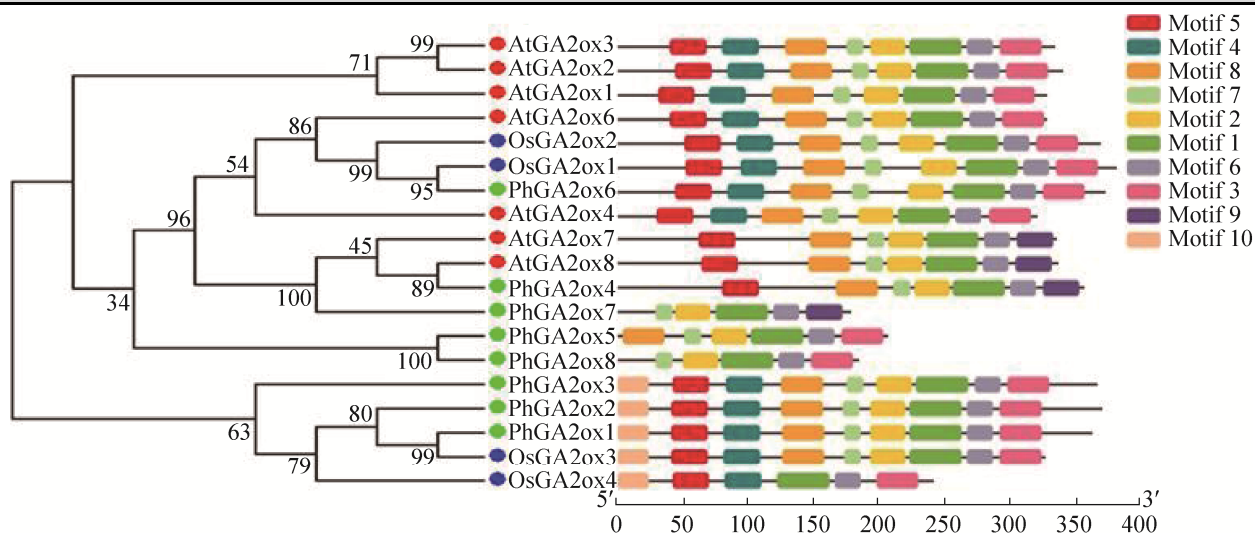


图 3 GA2ox 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 3 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of GA2ox family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

表 5 GA2ox 保守基序注释

Table 5 Motif sequences of GA2ox

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	3.5e-399	41	RDGQWVSVPDPDPSAFFVNVGDSLQVLTNGRFKSVRHRVVAN
Motif 2	4.0e-228	28	GGVIGFGEHTDPQIJSVLRSNDTGGLQI
Motif 3	5.9e-221	33	EGEPSLYREFTWGEYKKAAYKSRLGDNRLGLFE
Motif 4	5.4e-177	29	KDRAGPASPFPGYGSKRIGFNGDVGWLEYL
Motif 5	5.5e-162	29	IVKACEEFGFFKVNVHGVPPDLVERLEAE
Motif 6	1.6e-144	21	SRVSMIYFAGPPLEARIAPLP
Motif 7	1.5e-105	14	SDSLLRLNHYPACP
Motif 8	7.2e-104	33	SPASFRAAVNEYIEAVRKLACEVLELVAEGLGI
Motif 9	6.5e-022	29	YRPFSFREYREQVEDVKKTGSKVGLPRF
Motif 10	2.3e-018	25	MVVLAKPPAVDQIPLLRSPDPGDYF

基因家族缺少了 Motif 9；同样在毛竹的 PhGA2ox5、PhGA2ox7、PhGA2ox8 蛋白存在着许多片段的丢失，表明该组基因在不同的物种中可能存在着部分功能的异化。

GA20ox、GA3ox、GA2ox 这 3 类赤霉素氧化酶都属于 2OG-Fe (II) oxygenase 亚家族，蛋白序列都含有 2OG-Fe 保守结构域。研究赤霉素氧化酶基因家族在拟南芥、水稻和毛竹这 3 个物种中的进化属性发现，功能不同的 GA20ox、GA3ox、GA2ox 聚类分布在不同的亚家族中 (图 4)。在 3 个物种中，GA20ox 和 GA2ox 的基因数目均多于 GA3ox，表明 GA20ox 和 GA2ox 经历了动态进化路线，导致更多功能的冗余。

2.1.3 赤霉素的信号转导基因

赤霉素信号通路的发现来源于对水稻赤霉素受体 OsGID1 的研究；相对于水稻，拟南芥中含有 3 种 GID1 的同源类似蛋白，分别是 AtGID1A、AtGID1B 和 AtGID1C。通过蛋白序列同源比对，在毛竹基因组文库中找到 2 个 GID1 成员，命名为 PhGID1A 和 PhGID1B，与水稻同源蛋白的相似性分别为 89.34% 和 80.87%。系统进化树与保守基序的分析均显示 GID1 在不同的物种中高度保守 (图 5，表 6)。

在毛竹基因组文库中找到了 2 个 DELLA 的成员，命名为 PhSLR1 和 PhGAI。构建的系统演

化树 (图 6) 显示毛竹的 DELLA 类基因与水稻更加近缘；并且在毛竹的 2 个 DELLA 蛋白都存在着保守序列的缺少现象，其中 PhSLR1 蛋白中缺少了 Motif 1、5、8、10；而 PhGAI 蛋白中缺少了 Motif 4、6、7、10，可能它们上功能上出现了异化和互补 (表 7)。

F-Box 蛋白在毛竹基因组文库中有了 2 个 F-Box 的成员，命名为 PhGID2A 和 PhGID2B，其中 PhGID2A 与水稻同源性更高而 PhGID2B 与拟南芥更加近缘。F-Box 家族蛋白序列长度短且保守基序数目少，但是在不同的物种中具有着高度的保守性 (图 7，表 8)。

2.2 毛竹幼苗对外源 GA₃ 的响应

2.2.1 生长参数统计

将记录的种子萌发数据进行统计，分别计算不同浓度处理后的种子萌发率，结果显示 GA₃ 处理显著提高了毛竹种子的萌发率 (图 8A)。100 mg/L 处理组的萌发率最高，达到了 67%，50 mg/L 处理组和 200 mg/L 处理组的萌发率分别是 59% 和 54%，均高于对照组的 43%，说明在一定范围内不同浓度的赤霉素浸泡毛竹种子均能提高其种子萌发率且种子萌发的最佳赤霉素浓度在 100 mg/L 左右。200 mg/L 处理组的萌发率虽高于对照组但已呈现下降趋势，说明过高浓度的赤霉素反而会造成生长逆境，抑制种子的萌发。

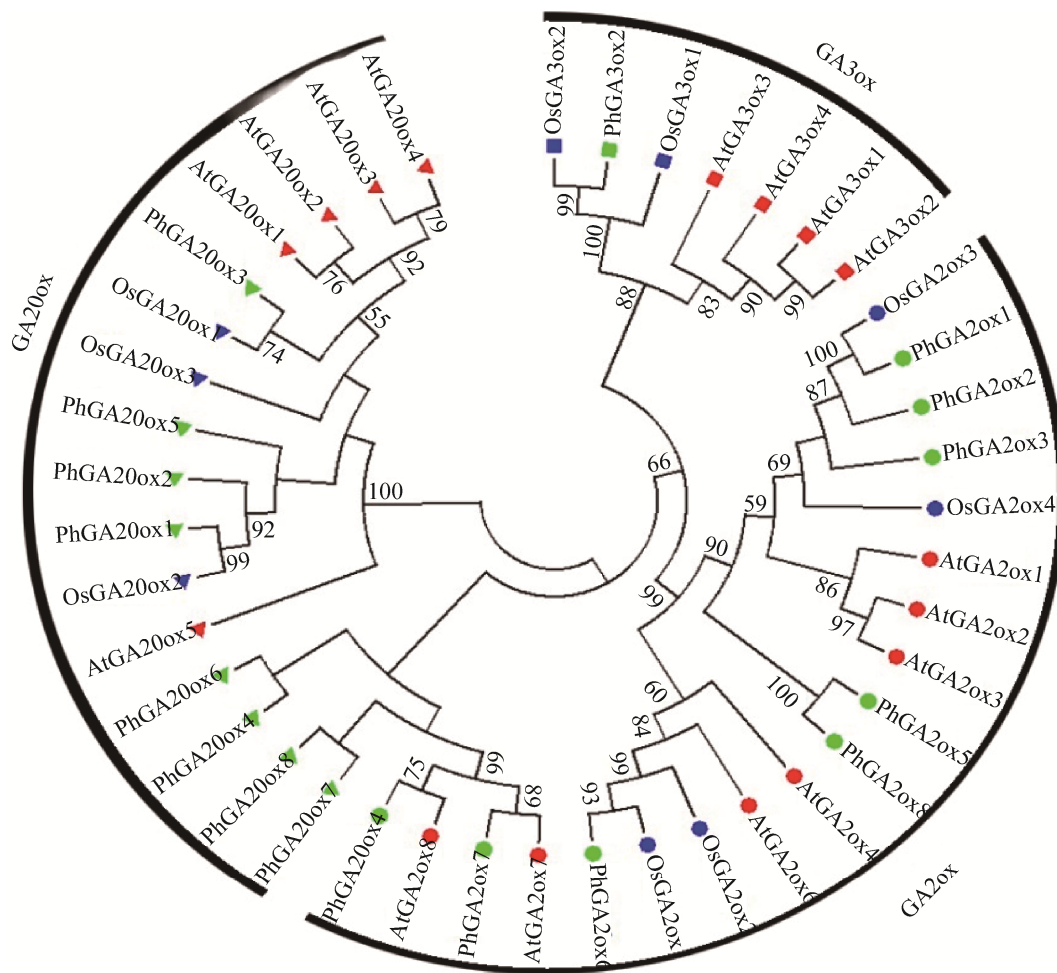


图4 GA2ox、GA3ox 和 GA20ox 的系统进化树

Fig. 4 An unrooted phylogenetic tree representing relationships of GA2ox, GA3ox and GA20ox. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

同时,用不同浓度的 GA_3 浸泡毛竹种子,萌发后的毛竹幼苗的根茎叶长度都有所增加(图8B-D)。茎长和叶长增加效果显著,3个处理组的主茎长度分别提高了44.0%、55.1%、50.1%;主叶长度分别提高了41.4%、62.9%、55.9%。赤霉素浓度在100 mg/L时茎与叶达到最佳的生长效果,200 mg/L赤霉素处理虽然促进效果仍显著,但是相比100 mg/L已经有了一定程度的抑制。而根系的增长效果不明显,3个处理组仅分别增加了1.8%、4.8%、5.4%。表明外源赤霉素可以有效刺激毛竹

的营养生长,明显促进了茎和叶的生长,但对根的生长基本无促进作用。另外,赤霉素处理的毛竹幼苗,“疯长”现象仅体现在垂直方向上的高度,茎秆细长没有粗度上的增加,并且大量出现倒伏现象。

2.2.2 外源 GA_3 处理下赤霉素作用相关基因的表达变化

通过 qRT-PCR 检测不同浓度(0、50、100、200 mg/L)赤霉素 GA_3 处理下 *PhGA20ox1*、*PhGA3ox1*、*PhGA2ox1*、*PhGID1A*、*PhGID2A* 和 *PhSLR1* 的相对表达量(图9)。

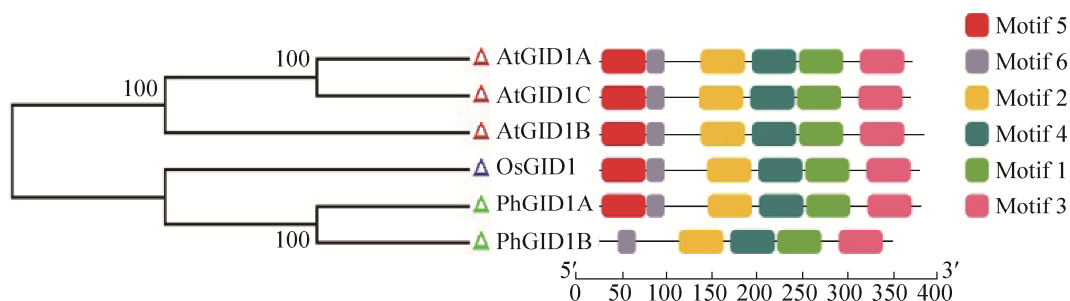


图5 GID1 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 5 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of GID1 family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

表6 GID1 保守基序注释

Table 6 Motif sequences of GID1

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	6.4e-177	50	MFGGNERTESEKRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEGEDRDHPACNPFGR
Motif 2	2.9e-154	50	FFHGGSFHSSANSAYDTLCRRLVKLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYD
Motif 3	1.3e-124	50	LDLTCDRQLAYAEGLKEDGLEVKLVHLEKATVGFYLLPNTDHYHEVMEEI
Motif 4	8.8e-114	50	WVMSQPWLRSKGDAQVRVFLAGDSSGGNIAHHVAVRAADEGKVLGNILL
Motif 5	3.7e-104	50	MAGSDEVNLNECKTVVPLNTWVLISNFKLAYNILRRPDGTFNRDLAEYLD
Motif 6	2.8e-031	21	RKVPANARPVEGVFSFDHIID

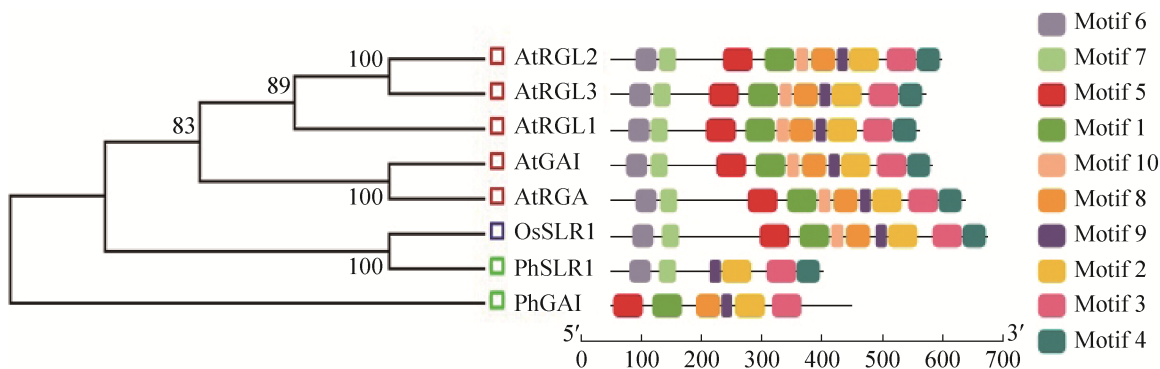


图6 DELLA 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 6 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of DELLA family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

应用外源性赤霉素 GA_3 处理后, *PhGA20ox1* 的表达量显著下调, 且外源赤霉素浓度越高其表达水平越低。相一致的是, 参与赤霉素生物合成的基因 *PhGA3ox1* 在各个浓度处理组中都显示下调。而 *PhGA20ox1* 在 GA_3 处理后的幼苗中表达量升高, 并且在高浓度处理组的表达量更高。至于信号转导的相关基因, *PhSLR1* 的

相对表达量受到了 GA_3 严格的负反馈, 各个浓度的处理组与对照组相比全部下调表达; 而 GA_3 处理却使 *PhGID2A* 表现为极显著的上调表达, 200 mg/L 处理组的 *PhGID2A* 表达量达到了对照组的 2.7 倍。赤霉素受体 *PhGID1A* 对外源 GA_3 的浓度变化不敏感, 在各个处理组的表达量都略高于对照组。

表 7 DELLA 保守基序注释

Table 7 Motif sequences of DELLA

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	7.8e-174	50	IEKVLGTVKAIKPRIVTVVEQEANHNGPVFLDRFTESLHYYSTLFDSLEG
Motif 2	1.7e-173	50	EVYLGRQICNVVACEGPDRVERHETLAQWRNRFGSAGFEPVHLGSSNAFKQ
Motif 3	1.4e-162	50	QMHFYESCPYLKFAHFTANQAILEAFAGAKRVHVIDLGLNQGLQWPALMQ
Motif 4	7.7e-129	39	ASMLLALFAGGDGYRVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWK
Motif 5	1.0e-121	50	ACAEAVQQENLTADALVKQIGLLAASQAGAMRKVATYFAEALARRIYRJ
Motif 6	1.9e-103	49	KKKMMAAEAGEENGVDPELLAVLGYKVRSSDMADVAQKLEQLEMVMSNGQ
Motif 7	1.9e-078	29	SHLATDTVHYNPSDLSSWVESMLSELNPP
Motif 8	1.0e-070	50	GPPQPDNSDYLQEVGWKLAQLAZAIGVEFEYRGLVANSLADLEPEMLELR
Motif 9	9.8e-045	21	EPETVAVNSVFELHRLLAQPG
Motif 10	1.0e-021	15	ALALRPGGPPSFRLT

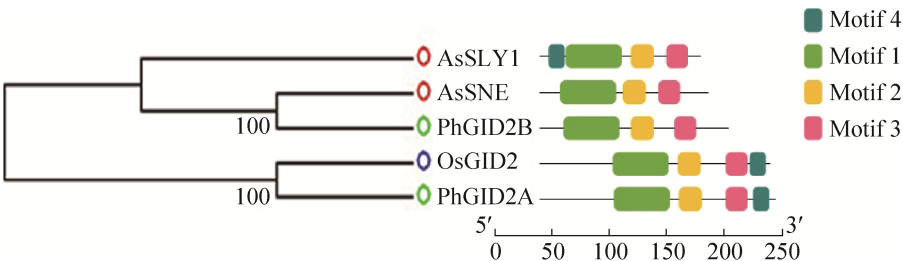


图 7 F-Box 家族系统进化树和保守基序分析

Fig. 7 An unrooted phylogenetic tree and conservative Motif analysis of F-Box family. At representing *A. thaliana*, Os representing *O. sativa*, Ph representing *P. edulis*.

表 8 F-Box 保守基序注释

Table 8 Motif sequences of F-Box

Motif	E-value	Length	Consensus sequence
Motif 1	1.3e-048	50	PBLGEDLVFEVLRRLDARTLAAAACVSRLWRQVAEDERLWEALCVREWAN
Motif 2	6.8e-018	21	LRAVVLALGGFRRLHALYIRP
Motif 3	3.8e-016	20	GRDQLQLSLSLFSIGYYERM
Motif 4	6.7e-004	15	CPKKDKGNDSDKNNGG

对 4 周龄毛竹幼苗喷施 100 mg/L GA₃, 通过 qRT-PCR 检测其在处理后不同时期 (0、1、3、6、12、24 h) *PhGA20ox1*、*PhGA3ox1*、*PhGA2ox1*、*PhGID1A*、*PhGID2A* 和 *PhSLR1* 的相对表达量 (图 10)。结果显示这些基因在 GA₃ 处理后的 24 h 内表达量都发现了显著的变化。赤霉素生物合成相关基因 *PhGA20ox1* 和 *PhGA3ox1* 整体呈表达量下

调趋势。其中 *PhGA20ox1* 在处理 3 h 表达量达到最低, 仅为对照的 43.8%, 之后开始升高但仍低于未处理组, 处理后 24 h 的表达量为未处理时的 80.1%; 而 *PhGA3ox1* 对 GA₃ 的响应有一个更为复杂的过程, 其表达量也是在 3 h 时达到最低, 只有对照组的 32.9%, 而 6 h 时恢复到了未处理时的表达水平, 随后在 12 h 和 24 h 又出现了明显的

降低和升高,最终在 24 h 时的表达量开始相比未处理时提高了 38.9%。赤霉素代谢基因 *PhGA20ox1* 在 GA_3 处理后表达量开始显著上调,1 h 时的表达量比对照提高了 67.0%,随后开始持续下降,12 h 后的表达量下降到了未处理时的水平,24 h 后表达量为对照的 111.5%。赤霉素受体基因 *PhGID1A* 在外源赤霉素处理过程中变化相对温和,在最初的 1 h 和 3 h,表达量比对照下降了 18.2%和 30.8%,6 h 时的表达量升高到了未处理时的 111.6%,12 h 开始略微下降,24 h 时又逐渐升高到了未处理时的 125.7%。*PhGID2A* 在处理后的各个时间段均表达上调,1 h 时表达量上调 10.9%,3 h 时已急剧上升为对照的 237.8%,达到最高,随后逐渐下降但所有处理时间段表达量均高于未处理组,24 h 表达量降至对照的 121.6%。*DELLA* 类基因 *PhSLR1* 表达量随时间不断呈现下

调-上调-下调的趋势,然而在每个时间段的表达量均未高于对照组,最低的表达量出现在 6 h,为对照组的 45.4%。

2.3 毛竹笋不同节间的表达分析

赤霉素关键基因在 1.5 m 高毛竹笋 3 个节间均检测到表达,并且各个基因的表达趋势在 3 株重复中具有较好的一致性,推测这些基因在毛竹快速生长的过程都发挥着一定的作用(图 11)。赤霉素生物合成相关的基因家族 *PhGA20ox* 和 *PhGA3ox* 在毛竹笋的不同部位都高表达,尤其是在顶部和中部;而调控赤霉素失活的 *PhGA2ox* 基因家族也在毛竹笋的形态学上端高表达。赤霉素受体 *PhGID1* 表达主要集中在顶部和中部,基部基本上没有检测到表达。*PhGID2* 在 3 个部位也都有表达,其中顶部的表达量最高,基部表达量最低,但不同部位的表达差异不

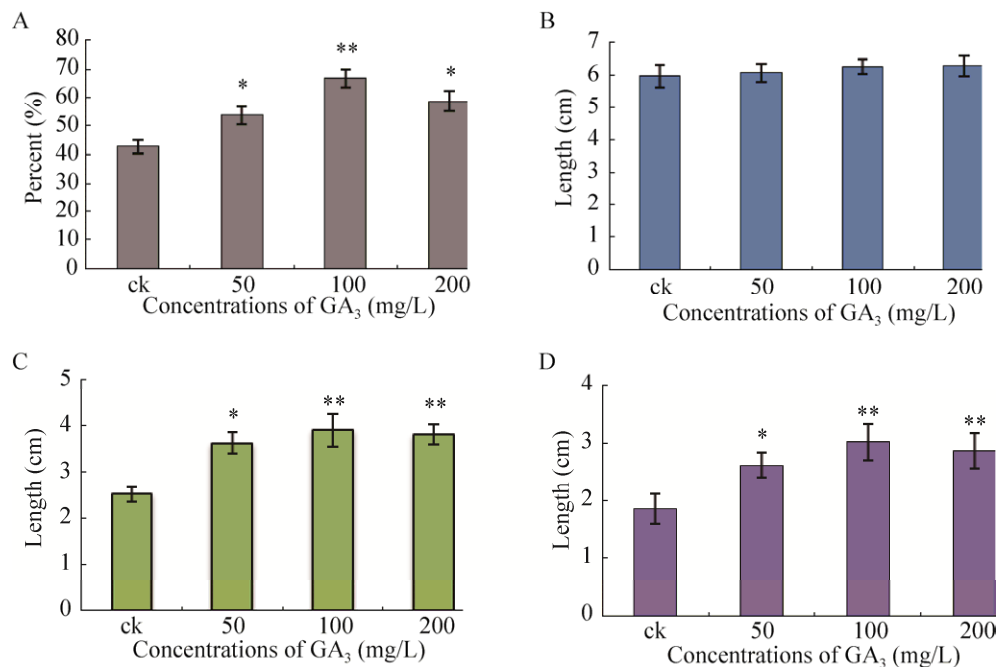


图 8 GA_3 处理对毛竹种子萌发率和幼苗生长的影响

Fig. 8 Effect of GA_3 treatment on seed germination rate and seedling growth of *P. edulis*. Statistical significance was calculated using LSD t-test(* $P<0.05$, ** $P<0.01$). (A) Seed germination rate. (B) Main root length. (C) Main stem length. (D) Main leaf length.

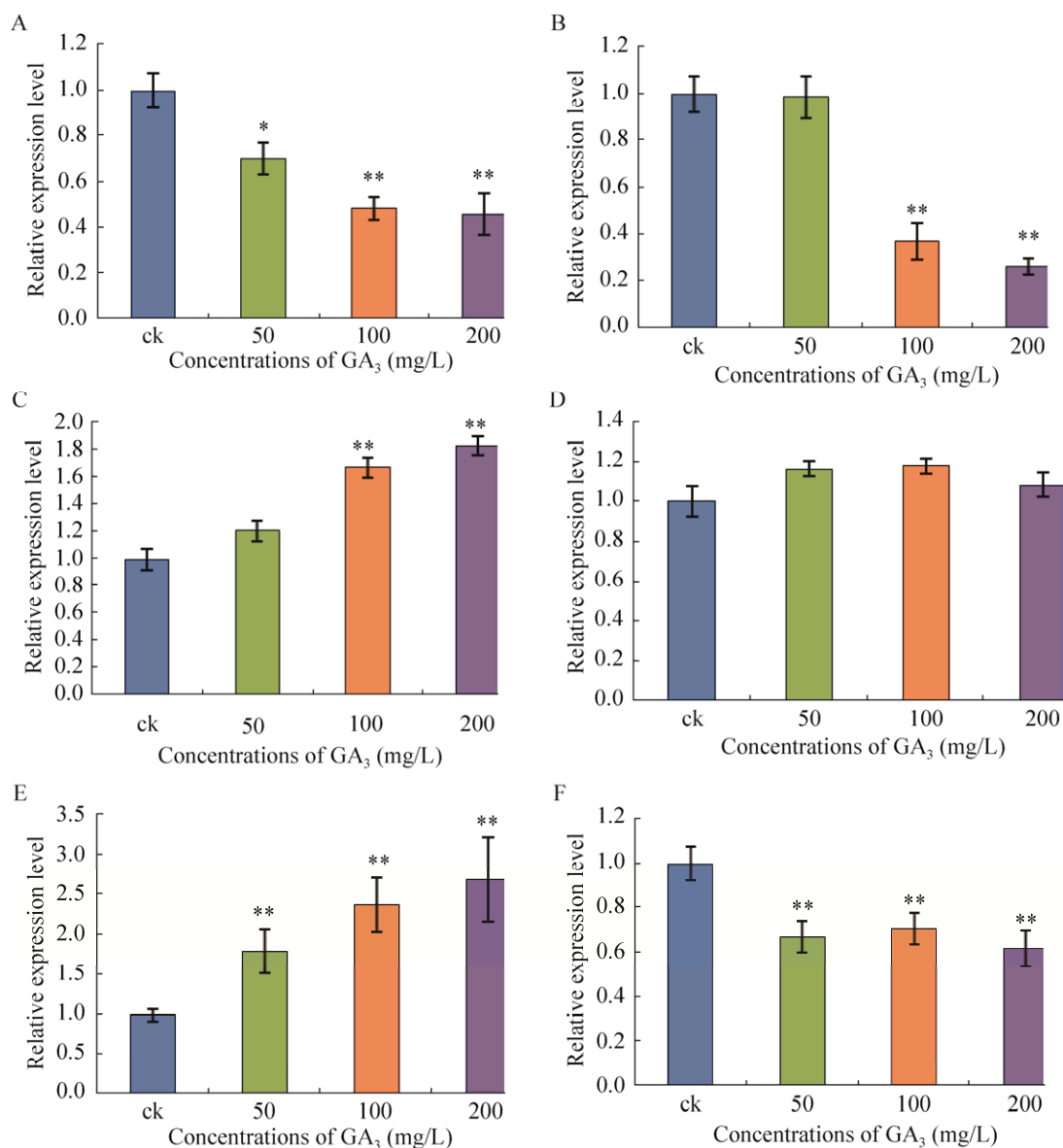


图9 不同浓度 GA₃ 处理 4 周龄毛竹幼苗后的基因表达水平分析

Fig. 9 Genes expression analysis after treatment with different concentrations of GA₃. The materials used are the stem and leaf tissue of four-week-old bamboo seedlings. Statistical significance was calculated using LSD *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01). (A) *PhGA20ox1*. (B) *PhGA3ox1*. (C) *PhGA20ox1*. (D) *PhGID1A*. (E) *PhGID2A*. (F) *PhSLR1*.

是很明显；而 *DELLA* 相关基因在根部的表达量显著高于顶部及中部。可以看出，*PhGID1* 与 *PhGID2* 的表达具有一致性，而与 *DELLA* 的表达趋势相反。

3 讨论

毛竹是我国分布面积最广且经济价值最高的竹种，毛竹笋的生长速度很快，高生长时期每天净

高度增长量高达 50 cm 以上，这种快速生长的机理具有重要的学术研究价值。前人的大量研究发现，毛竹的高生长过程伴随着赤霉素等植物激素含量的急剧增加^[24, 31]，因此推测赤霉素在毛竹的快速生长中发挥着重要的作用。在竹笋快速生长过程中，对赤霉素动态变化及其关键基因表达量变化的研究有助于我们了解毛竹茎秆快速伸长的机制。

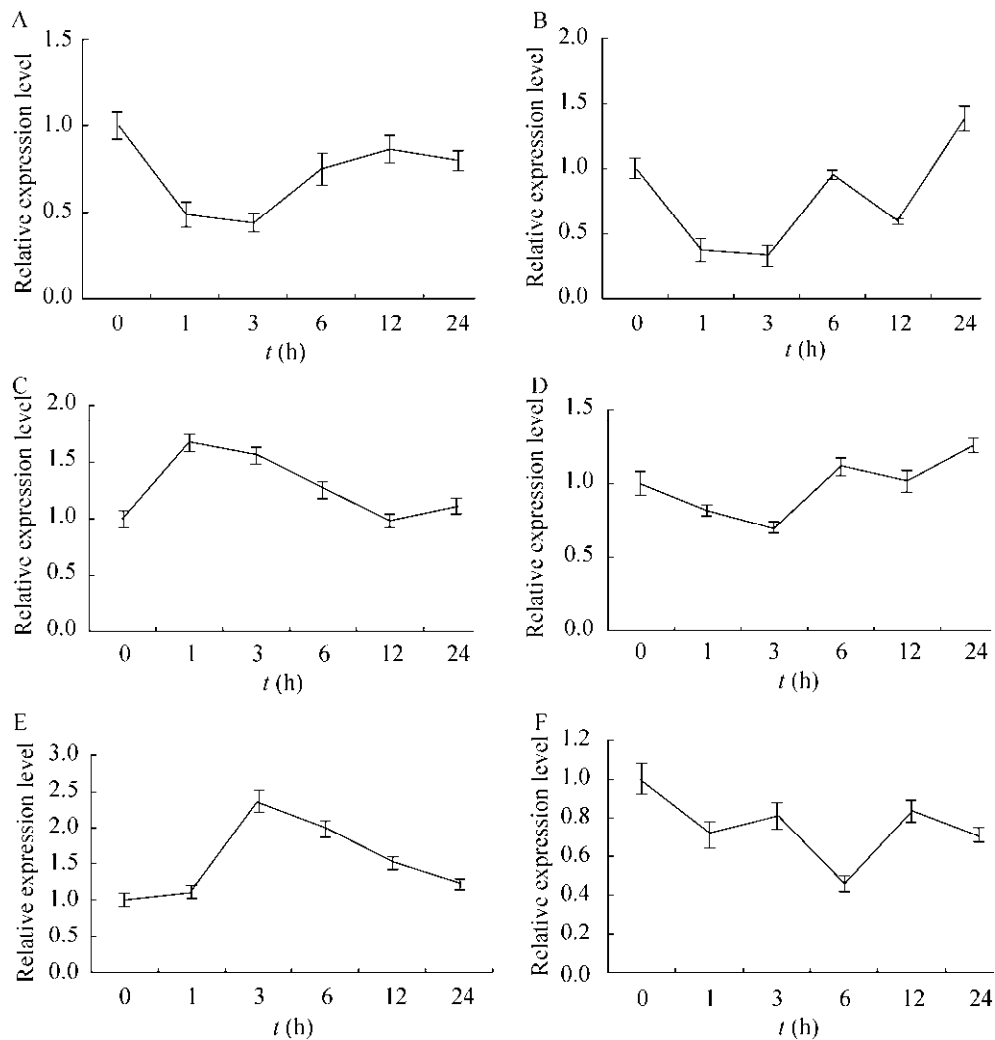


图 10 GA_3 处理后不同时间段的基因表达水平分析

Fig. 10 Genes expression analysis at different time points after GA_3 treatment. The materials used are the stem and leaf tissue of four-week-old bamboo seedlings. (A) *PhGA20ox1*. (B) *PhGA3ox1*. (C) *PhGA2ox1*. (D) *PhGID1A*. (E) *PhGID2A*. (F) *PhSLR1*.

通过生物信息学分析,从毛竹基因组中共鉴定出了 17 个赤霉素合成代谢基因和 6 个信号转导的相关基因。相比于拟南芥、水稻、玉米等植物,毛竹基因组更为庞大,但是参与赤霉素生物合成和信号转导的基因成员数量却较少,尤其是 GA_3 氧化酶家族,仅检索到了 1 位成员。这可能是由于本次研究删去了大量序列相似性较低的同源基因以及冗余基因,并且当前的毛竹基因组存在着个别序列的注释信息不完全和 CDS 缺失等组装问题。另一种假设是由于物种分化后,草

本植物中竹子在蛋白质直系同源簇数据库(COGs)的构建和扩增中种类数量最多^[25],因此导致毛竹中的基因家族比其他物种更加分散和极化。拟南芥、水稻和毛竹的赤霉素相关基因的系统发育分析显示赤霉素的合成代谢与信号传导途径基因在这些物种中是高度保守的。而毛竹的大多数基因与水稻的同源基因相似性更高,可能毛竹与水稻的赤霉素关键基因在进化关系上有着共同的祖先^[32],而序列的高保守性预示着功能的保守性。

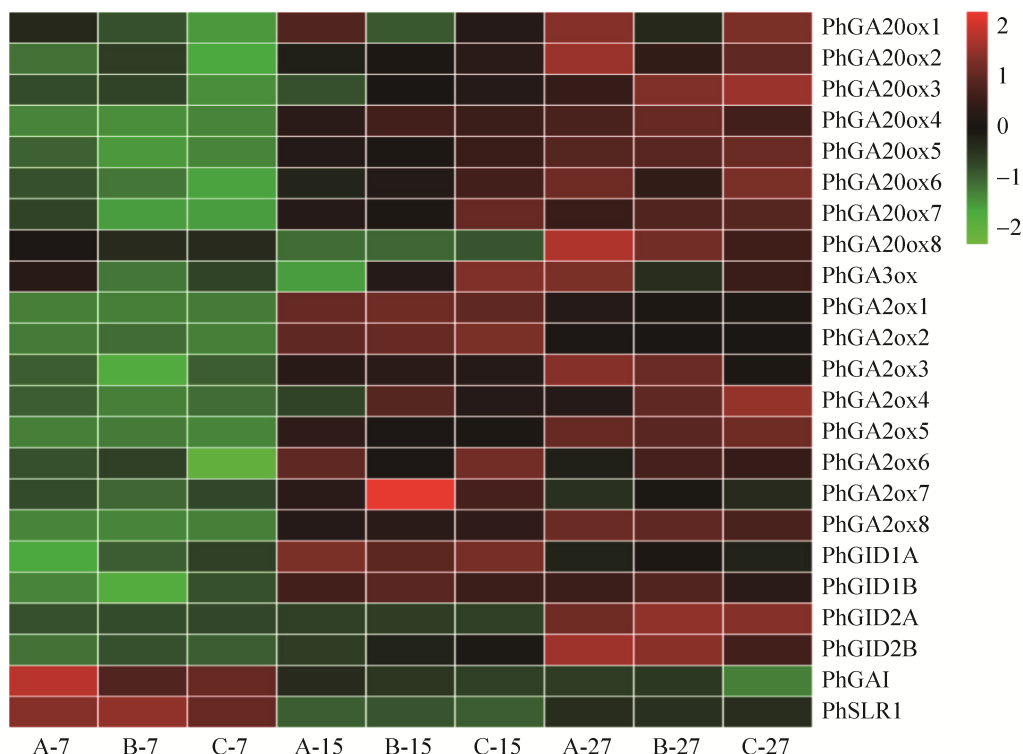


图 11 赤霉素关键基因在毛竹笋不同部位的表达分析

Fig. 11 Expression analysis of gibberellin-related genes in different internodes of bamboo shoots. (A-7, B-7, C-7 respectively representing the 7th internodes of 3 different bamboo shoots; A-15, B-15, C-15 respectively representing the 15th internodes of 3 different bamboo shoots; A-27, B-27, C-27 respectively representing the 27th internodes of 3 different bamboo shoots).

赤霉素参与调控植物生理发育的各个过程, 包括种子萌发、根的生长、茎的伸长和叶片伸展等。王巍等^[33]用不同浓度的 GA_3 处理核桃种子, 发现 300 mg/L 的 GA_3 处理组发芽率最高达到了 87.2%。高春智等^[34]在樟子松上的研究也表明, 喷施 GA_3 能显著提高樟子松种子的发芽率。毛竹自然结实率低且种子采集困难, 室温贮藏还会使种子丧失发芽能力, 这些都在一定程度上限制了毛竹实生苗的培育工作。本研究用不同浓度的 GA_3 处理毛竹种子的实验也同样表明, 用不同浓度的 GA_3 浸种后促进了毛竹种子的萌发并且 100 mg/L GA_3 的促进效果最显著, 并且有着最佳的浓度范围。吴建明等^[35]研究发现赤霉素处理可以诱导甘蔗节间伸长, 增加株高; 杨益善等^[36]在

水稻上的研究也发现, 赤霉素可以促进水稻茎的伸长。我们同时比较了不同浓度 GA_3 浸种处理对毛竹幼苗根、茎、叶生长的影响, 结果与 GA_3 对发芽的效应一致, 赤霉素处理后的毛竹茎和叶的伸长促进效果明显, 并且最适浓度在 100 mg/L 左右, 而对根的影响效果不明显。总之, 赤霉素处理对毛竹种子的萌发与幼苗的生长均有明显的促进作用。

参与毛竹生物合成的相关基因对于外源 GA_3 的响应有着协调一致性, 外施 GA_3 使毛竹幼苗内的赤霉素生物合成基因 *PhGA20ox1* 和 *PhGA3ox1* 表达量明显下调, 并且浓度越高对基因表达的抑制作用越明显; 相反, 催化植物中活性 GAs 灭活的基因 *PhGA2ox1* 在高浓度的处理组表达量更高。

同时对 GA₃ 处理后的 5 个时期的表达量进行测定,发现 *PhGA20ox1* 表达量先下调后上调,整体表现下调趋势,而 *PhGA2ox1* 的表达量整体呈上调趋势。这与前人关于赤霉素处理植物的结论相同, Carrera 等^[37]研究表明,马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 的 gal 矮化突变体具有较高的 GA-20 氧化酶转录水平,外施 GA₃ 后,3 种 GA-20 氧化酶 (*StGA20ox1*、*StGA20ox2* 和 *StGA20ox3*) 在马铃薯 gal 突变体内表达明显减少;董凤等^[22]对苹果的研究也发现外施赤霉素会使 *GA20ox* 表达量减少而 *GA2ox* 表达增高。与 *PhGA20ox1* 的表达趋势不同,*PhGA3ox1* 的表达量在处理后的某段时期还出现了升高的现象,可能是因为 *GA3ox* 作为赤霉素生物合成的最后一步,在赤霉素含量骤然升高或降低时,*GA3ox* 起着更重要的反调节作用,从而维持植物体内赤霉素的平衡^[38]。并且,在外界 GA₃ 的刺激下,大量赤霉素受体基因与赤霉素相结合,导致赤霉素受体基因的表达量升高,结果与李俊等^[39]东方山羊豆在 GA₃ 处理下的基因表达水平相一致。总之,当外施 GA₃ 时,一方面毛竹幼苗通过抑制体内赤霉素合成反应并加强体内活性赤霉素灭活基因 *GA2ox* 的表达,来实现植物体内 GA 水平的稳态平衡;另一方面,赤霉素受体基因 *GID1* 及正调控因子基因 *F-Box* 的表达水平显著提高,解除了 DELLA 蛋白的积累对毛竹生长的阻遏作用,植株表现出正常的赤霉素反应。

本研究选取了快速生长期毛竹笋的基部、中部和顶部节间进行 qRT-PCR 分析,通过组织特异性分析发现,在毛竹笋快速生长阶段的 3 个节间,赤霉素合成代谢与信号转导途径关键酶基因的表达量均发生了一定变化。生物合成相关基因家族 *PhGA20ox* 和 *PhGA3ox* 在毛竹笋的形态学上部都过量表达,为顶端节间的伸长提供了充足的内源激素;而调控赤霉素代谢的基因家族

PhGA2ox 在中部和顶部也高表达,毛竹笋幼嫩部位的生命活动最旺盛,大量合成赤霉素,*PhGA2ox* 的高表达能够将过量合成的赤霉素进行降解^[13]。丁兴萃^[31]曾分析了毛竹笋各部位的内源激素含量及动态变化,发现在竹笋生长初期,赤霉素在笋尖合成,通过极性运输到中部,一般赤霉素在各个部位的含量为顶部>中部>基部。而本研究从合成代谢关键基因进行分析,发现基因表达模式和赤霉素体内含量分布一致。信号转导途径的基因 *PhGID1* 和 *PhGID2* 在笋的各个部位也都有表达,并且在笋顶部和中部表达要明显高于基部。而 DELLA 类蛋白相关基因表达趋势相反,在毛竹笋形态学上部的中部和顶部表达量非常低甚至没有检测到表达。这三类基因已在其他物种中广泛报道,DELLA 的大量表达抑制植物的生长伸长,是赤霉素的负调控基因;*GID1* 是赤霉素的受体,能够感知赤霉素信号并介导 DELLA 类蛋白的泛素化降解;*GID2* 是降解 DELLA 蛋白的泛素酶体复合物的主要成分,DELLA 的降解使赤霉素得以大量表达并诱导植物快速生长^[15, 40]。毛竹笋中赤霉素信号转导途径相关基因的表达模式与其生物学功能也是相吻合的:毛竹笋进入快速生长阶段,笋尖大量合成赤霉素,*PhGID1* 大量表达并接收赤霉素信号,然后与 DELLA 蛋白形成 *GID1-GA-DELLA* 复合体,阻止赤霉素信号的传递;此时大量表达的 *PhGID2* 将 DELLA 蛋白泛素化标记并介导其降解,DELLA 的阻遏作用解除,赤霉素大量表达,笋开始快速生长。

4 结论

本研究对赤霉素生物合成与信号转导途径的相关基因家族在毛竹中的同源基因进行了系统的鉴定,找到了 6 个多基因家族编码的蛋白,包括参与赤霉素合成代谢的 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 以及信号转导途径的 *GID1*、*GID2* 和

DELLA 蛋白。并初步探索了外源赤霉素处理对毛竹种子萌发的影响,证明了赤霉素在毛竹中也有着促进种子萌发和促进茎秆伸长等作用,且有最佳的浓度范围;同时,外施赤霉素会引起毛竹体内赤霉素相关基因表达模式变化,植物体通过反馈调节的方式控制体内活性 GA 的平衡。另外,本研究还发现了大量的赤霉素类基因参与到毛竹的快速生长这一复杂的生理过程中,并且基因的表达模式与毛竹体内的赤霉素含量分布一致,也与其生物学功能一致,为深入探讨赤霉素调控竹子生长发育的机制奠定了基础。但是,本研究尚未进行基因克隆等方面的分析,在后续的试验中应当重点关注。

REFERENCES

- [1] Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*, 2012, 444(1): 11–25.
- [2] Silverstone AL, Sun TP. Gibberellins and the green revolution. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(1): 1–2.
- [3] Reinecke DM, Wickramaratna AD, Ozga JA, et al. *Gibberellin 3-oxidase* gene expression patterns influence gibberellin biosynthesis, growth, and development in pea. *Plant Physiol*, 2013, 163(2): 929–945.
- [4] Phinney BO, West CA, Ritzel M, et al. Evidence for “Gibberellin-like” substances from flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1957, 43(5): 398–404.
- [5] Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, et al. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2172–2181.
- [6] Law DM, Davies J. Comparative indole-3-acetic acid levels in the slender pea and other pea phenotypes. *Plant Physiol*, 1990, 93(4): 1539–1543.
- [7] Lange MJP, Lange T. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biol*, 2006, 8(3): 281–290.
- [8] Achard P, Cheng H, de Grauwe L, et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 2006, 311(5757): 91–94.
- [9] Okada K, Saito T, Nakagawa T, et al. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1045–1056.
- [10] Gao CC, Ni J, Chen MS, et al. Characterization of genes involved in Gibberellin metabolism and signaling pathway in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Plant Diver Resour*, 2015, 37(2): 157–167 (in Chinese).
高聪聪, 倪军, 陈茂盛, 等. 能源植物小桐子赤霉素合成代谢及信号转导相关基因的鉴定及序列分析. *植物分类与资源学报*, 2015, 37(2): 157–167.
- [11] Hedden P, Phillips AL. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(12): 523–530.
- [12] Vagts DA, Iber T, Szabo B, et al. Effects of epidural anaesthesia on intestinal oxygenation in pigs. *Br J Anaesth*, 2003, 90(2): 212–220.
- [13] Wuddineh WA, Mazarei M, Zhang JY, et al. Identification and overexpression of *gibberellin 2-oxidase (GA2ox)* in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for improved plant architecture and reduced biomass recalcitrance. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(5): 636–647.
- [14] Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(7): 784–788.
- [15] Fleet CM, Sun TP. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1): 77–85.
- [16] Zentella R, Zhang ZL, Park M, et al. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3037–3057.
- [17] Phillips AL, Ward DA, Uknes S, et al. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1995, 108(3): 91–94.

- 1049–1057.
- [18] Sakai M, Sakamoto T, Saito T, et al. Expression of novel rice gibberellin 2-oxidase gene is under homeostatic regulation by biologically active gibberellins. *J Plant Res*, 2003, 116(2): 161–164.
- [19] Lange MJP, Liebrandt A, Arnold L, et al. Functional characterization of gibberellin oxidases from cucumber, *Cucumis sativus* L. *Phytochemistry*, 2013, 90: 62–69.
- [20] Rodrigo MJ, García-Martínez JL, Santes CM, et al. The role of gibberellins A₁ and A₃ in fruit growth of *Pisum sativum* L. and the identification of gibberellins A₄ and A₇ in young seeds. *Planta*, 1997, 201(4): 446–455.
- [21] Umetsu A, Sawada Y, Mitsuhashi W, et al. Characterization of a loss-of-Function mutant of gibberellin biosynthetic gene LsGA3ox1 in lettuce. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(12): 2398–2400.
- [22] Dong F, Fan S, Ma XL, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *GA2ox*, *GA3ox* and *GA20ox* in apple. *Acta Horticult Sin*, 2018, 45(4): 613–626 (in Chinese).
董凤, 樊胜, 马小龙, 等. 苹果赤霉素氧化酶基因 *GA2ox*、*GA3ox* 和 *GA20ox* 家族全基因组鉴定及表达分析. *园艺学报*, 2018, 45(4): 613–626.
- [23] Ogita S, Nomura T, Kishimoto T, et al. A novel xylogenic suspension culture model for exploring lignification in *Phyllostachys bamboo*. *Plant Methods*, 2012, 8: 40.
- [24] Cui K. The mechanism research of fast-growing culms of *Phyllostachys heterocycla*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2011 (in Chinese).
崔凯. 毛竹茎秆快速生长的机理研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.
- [25] Peng ZH, Lu Y, Li LB, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461.
- [26] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evolut*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [27] Wang WJ, Gu LF, Ye SW, et al. Genome-wide analysis and transcriptomic profiling of the auxin biosynthesis, transport and signaling family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *BMC Genomics*, 2017, 18: 870.
- [28] Qi FY, Hu T, Peng ZH, et al. Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in Moso bamboo. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2013, 33(1): 48–52 (in Chinese).
齐飞艳, 胡陶, 彭镇华, 等. 毛竹实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选及成花基因 *PheTFL1* 表达分析. *西北植物学报*, 2013, 33(1): 48–52.
- [29] Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A*, 2010, 73(11): 1050–1057.
- [30] Zhao M, Chen O, Jin CS, et al. Study on decrease in Hrad17 expression in head and neck squamous carcinoma. *Chin J Lab Diag*, 2010, 14(9): 1380–1383 (in Chinese).
赵明, 陈鸥, 金春顺, 等. Hrad17 在头颈肿瘤中表达下降的研究. *中国实验诊断学*, 2010, 14(9): 1380–1383.
- [31] Ding XC. Dynamic analysis for endogenous phytohormones of bamboo shoot (*Phyllostachys heterocycla* var. *Pubescens*) during different growth and differentiation state. *J Bamboo Res*, 1997, 16(2): 53–62 (in Chinese).
丁兴萃. 毛竹笋体生长发育过程中内源激素的动态分析. *竹子学报*, 1997, 16(2): 53–62.
- [32] Li SX, Yin TM, Zou HY, et al. Preliminary study on molecular systematics of bamboo by SSR primers derived from rice. *Sci Sil Sin*, 2002, 38(3): 42–48 (in Chinese).
李淑娴, 尹佟明, 邹惠渝, 等. 用水稻微卫星引物进行竹子分子系统学研究初探. *林业科学*, 2002,

38(3): 42–48.

- [33] Wang W. Effect of different concentration treatments of GA₃ on seed germination and seedling growth of *Juglans regia* L. J Hebei For Sci Technol, 2017, (1): 36–38 (in Chinese).

王巍. 不同浓度赤霉素处理对核桃种子萌发及幼苗生长的影响. 河北林业科技, 2017, (1): 36–38.

- [34] Gao CZ, He YH, Tian YL, et al. Effect of different concentration of gibberellin on the seed germination of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Litv. J Inner Mongolia Agric Univ, 2012, 33(3): 67–72 (in Chinese).

高春智, 何炎红, 田有亮, 等. 不同浓度赤霉素浸种对樟子松种子萌发的影响. 内蒙古农业大学学报, 2012, 33(3): 67–72.

- [35] Wu JM, Li YR, Yang L, et al. Relationship between gibberellin-induced internode elongation and endogenous hormone changes in Sugarcane. Chin J Trop Crops, 2009, 30(10): 1452–1457 (in Chinese).

吴建明, 李杨瑞, 杨柳, 等. 赤霉素诱导甘蔗节间伸长与内源激素变化的关系. 热带作物学报, 2009, 30(10): 1452–1457.

- [36] Yang YS, Xia JH, Tian JW, et al. Effects of spraying stage of gibberellin acid 3 on the internode elongation and heading related traits of PTGMS lines in rice. Res

Agric Modern, 2015, 36(6): 1099–1104 (in Chinese).

杨益善, 夏俊辉, 田继微, 等. 赤霉素喷施时期对水稻光温敏核不育系节间伸长和抽穗相关性状的影响. 农业现代化研究, 2015, 36(6): 1099–1104.

- [37] Carrera E, Jackson SD, Prat S. Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. Plant Physiol, 1999, 119(2): 765–773.

- [38] Yang YH, Xu H, Chen DF, et al. Research advances on the gene for gibberellin 3-beta-dioxygenase in higher plants. Biotechnol Bulletin, 2018, 34(4): 1–6 (in Chinese).

杨意宏, 徐浩, 陈端芬, 等. 高等植物赤霉素 3-β-双氧化酶基因研究进展. 生物技术通报, 2018, 34(4): 1–6.

- [39] Li J, Wen HY, Gao HW, et al. Construction of plant expression vector of GOGID gene and transformation of *Medicago sativa* L. Acta Agrest Sin, 2015, 23(1): 167–172 (in Chinese).

李俊, 温红雨, 高洪文, 等. 东方山羊豆 GOGJD 基因表达载体构建及紫花苜蓿转化. 草地学报, 2015, 23(1): 167–172.

- [40] Sun TP. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. Plant Physiol, 2010, 154(2): 567–570.

(本文责编 郝丽芳)