

## 雷竹 *PvJ3* 基因克隆及功能分析

陈晓沛, 施 泉, 郭小勤, 曹友志, 徐英武

(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)

**摘要:** 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中 *J3* 基因参与花期的调节, 调控开花时间。为了探究竹类植物中 *J3* 基因的功能, 根据植物中 *J* 同源基因的高度保守性, 采用同源克隆技术从雷竹 *Phyllostachys violascens* 中克隆出 1 个 *J3* 基因, 命名为 *PvJ3*。该基因的开放阅读框(ORF)区长为 1 260 bp, 编码 419 个氨基酸。通过同源比对和系统进化树分析, 可知雷竹 *PvJ3* 蛋白和其他物种中 *J3* 同源蛋白的氨基酸序列同源性很高。通过实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR), 发现 *PvJ3* 基因在同一竹鞭的笋、花芽、花, 开花与不开花雷竹的茎秆、成叶、幼叶中都有表达, 且开花雷竹茎秆中表达量最高, 表明 *PvJ3* 基因在雷竹各组织部位都有表达。亚细胞定位分析结果显示, *PvJ3* 蛋白定位在细胞质和细胞核。通过转化拟南芥对其功能进行了初步分析, 表型统计结果显示, *PvJ3* 转基因拟南芥与野生型相比, 开花时间明显提早, 而且出现多主茎现象, 表明 *PvJ3* 可以促使植物提前开花并且参与植物茎秆的发育。图 6 表 1 参 39

**关键词:** 林木育种学; 雷竹; *PvJ3*; 亚细胞定位; 功能分析

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)02-0298-08

## Cloning and functional analysis of the *PvJ3* gene from *Phyllostachys violascens*

CHEN Xiaopei, SHI Quan, GUO Xiaoqin, CAO Youzhi, XU Yingwu

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

**Abstract:** The *J3* gene mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis thaliana*. To explore the functions of the *J3* gene in bamboo plants, a *J3* homolog named *PvJ3* was isolated from *Phyllostachys violascens*, and a preliminary analysis of its function was conducted with *Ph. violascens*. Analyses included a sequencing alignment and phylogenetic analysis, real-time quantitative PCR, and protein subcellular localization. Results showed that the phenotype of overexpression of *PvJ3* in *Ph. violascens* predated flowering and had more main stems. The full-length ORF of the *PvJ3* in *Ph. violascens* was 1 260 bp which encoded 419 amino acids. The sequencing alignment and phylogenetic analysis of *PvJ3* showed a high homology with other species. Real-time quantitative PCR results showed that the *PvJ3* was expressed in all organs both in flowering and non-flowering bamboo plants and was highest in the stem of flowering bamboo plants. Protein subcellular localization showed that *PvJ3* was located in the cytoplasm and cell nucleus. These results suggest that *PvJ3* may promote flowering, may participate in stem development, and may provide a scientific basis for the regulation of bamboo flowering. [Ch, 6 fig. 1 tab. 39 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Phyllostachys violascens*; *PvJ3*; subcellular localization; functional analysis

开花是高等植物进入生殖生长的标志, 是植物完成生活史的必要环节。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中的研究发现, 开花过程受多种内源因素和外源环境因素的影响, 由复杂基因网络严格调控<sup>[1]</sup>。光周期途径中植物开花受季节性昼长变化影响<sup>[2]</sup>; 赤霉素(GA)途径是在非诱导光周期途径的条件下, 在

收稿日期: 2017-03-24; 修回日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270715, 30901155)

作者简介: 陈晓沛, 从事生物大分子结构与功能研究。E-mail: 970787428@qq.com。通信作者: 曹友志, 讲师, 博士, 从事林木分子生物学等研究。E-mail: yzcao@zafu.edu.cn

开花过程中发挥作用<sup>[3]</sup>; 春化途径中植物开花要受到低温积累的影响<sup>[4]</sup>; 自主途径中通过感知植物自身内部发育状态而调控植物开花<sup>[5]</sup>, 多种途径的成花调节信号最终都集中于 2 个整合因子: 开花促进因子 FLOERING LOCUS T(FT)和 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1(SOC1)<sup>[6-8]</sup>。在拟南芥中, 过表达 *FT* 基因会明显促进 *SOC1* 基因的表达量; 同时在 *ft* 突变体中, *SOC1* 的表达量明显下降<sup>[9-11]</sup>, 但是对 *ft* 和 *soc1* 双突变体与 *ft* 单突变体植株的开花时间进行统计, 结果显示没明显差异, 可知除 FT 蛋白调控 *SOC1* 的表达外, 还存在另外的途径影响 *SOC1* 基因的表达<sup>[10-13]</sup>。其他开花控制因子可以通过 *FT* 和 *SOC1* 参与开花途径的调控, 例如开花抑制因子 SHORT VEGETATIVE PHASE(SVP)可以结合 *SOC1* 和 *FT* 的调控序列, 对 *FT* 和 *SOC1* 产生抑制作用<sup>[14]</sup>, 进而下调它们的表达量。近年, 发现拟南芥中属于 J 蛋白家族一员的 J3 蛋白, 可以与 SVP 蛋白相互作用调控 *SOC1* 和 *FT* 基因的表达量, 而实现对成花信号的调节, 在调控开花途径中发挥着十分重要的作用<sup>[15]</sup>。J 蛋白(J-domain protein)是广泛存在于动植物中的一个庞大的分子伴侣家族, 该类蛋白 N 末端包含 1 个约由 70 个氨基酸构成的保守序列——J 结构域而被命名为 J 蛋白<sup>[16-17]</sup>。J 蛋白的 J 结构域由 4 个  $\alpha$ -螺旋组成, 第 2 和第 3 个螺旋之间有一个极为保守的由组氨酸、脯氨酸、天冬氨酸组成的 HPD 三肽, 这是 J 结构域的重要特征<sup>[18]</sup>; 邻近 J 结构域的是 G/F 结构域(富含甘氨酸和苯丙氨酸); 之后是锌指结构域。根据结构域的不同 J 蛋白可分为 4 类<sup>[19]</sup>: I 类 J 蛋白包含所有常见的结构; II 类 J 蛋白缺少锌指结构; III 类 J 蛋白只有 J 结构域; IV 类 J 蛋白也被称作 J-like 蛋白, 这类蛋白的 J 结构域没有 HPD 模块<sup>[20-21]</sup>。目前发现拟南芥中共有 120 个 J 蛋白, 其中 I 类 J 蛋白 8 个, II 类 J 蛋白 16 个, III 类 J 蛋白 92 个, IV 类 J 蛋白 4 个<sup>[22]</sup>。在植物中, 有关 J 蛋白的研究主要集中在拟南芥中, 现有的结果表明, J 蛋白可以参与多种生物学过程, 包括叶绿体的发育<sup>[23-25]</sup>、植物的抗逆性<sup>[26-27]</sup>、信号转导<sup>[28-29]</sup>和成花途径<sup>[15]</sup>等。在拟南芥开花调控中, J3 蛋白通过与 SVP 等其他开花关键因子相互作用而影响植物成花过程, *SVP* 的突变体 *svp-41* 表现为早花现象, *J3* 的突变 *j3-1* 表现为晚花现象, 同时在 *j3-1* 和 *svp-41* 的双突变体中, 拟南芥表现出早花现象, 与 *svp-41* 的单突变体的表型相似, 这一结果表明 *J3* 基因通过与 *SVP* 的相互作用实现对开花时间的调控<sup>[30-31]</sup>, 进一步研究发现在细胞核中 *J3* 基因通过与营养生长抑制因子(SVP)蛋白直接相互作用, 衰减 SVP 蛋白与 *SOC1* 和 *FT* 调控序列的结合从而上调 *SOC1* 和 *FT* 基因的表达量<sup>[15]</sup>。竹类植物开花周期较长并具有时间上的不确定性, 而且很多竹子开花后会成片死亡, 雷竹 *Phyllostachys violascens* 是一种优良的笋用竹种, 近年来, 雷竹普遍开花, 开花后部分雷竹会死亡, 导致雷竹笋产量大幅度下降, 带来严重的经济损失。有关竹类植物开花的研究已经很多, 但是竹子成花机制和花期调控模式至今尚未完全清楚<sup>[32]</sup>。目前, 竹子中还未见有关 *J3* 基因生物学功能的研究, 本研究以雷竹为研究对象, 通过同源克隆技术获得 1 个 *J3* 同源基因, 经过亚细胞定位、表达模式和功能分析, 以期能为深入研究 *J3* 同源基因在竹类植物开花调控机制中的作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

雷竹材料来源于浙江农林大学智能温室大棚, 选取位于同一竹鞭上的笋、花芽、花, 开花和不开花雷竹的幼叶、成叶、茎秆, 标记分装后放入液氮中速冻, 保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

### 1.2 核糖核酸(RNA)的提取及互补脱氧核糖核酸(cDNA)的合成

用全 RNA 提取试剂盒(鼎国)分别提取采集的雷竹材料的 RNA, 以提取的 RNA(少于  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )为模板, 用 Prime Script<sup>TM</sup> RT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒(Clontech), 反转录获得雷竹各组织的 cDNA, 检测合格后, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.3 目的基因的克隆及序列分析

通过本地 Blast, 从毛竹 *Phyllostachys edulis* 基因组文库中找到一个候选基因序列号(bphylf027h21), 根据该候选基因的基因序列设计引物(*J3*, 表 1), 雷竹 cDNA 为模板, 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增条带, 用胶回收试剂盒(上海生工生物公司)回收纯化电泳条带, 将获得的片段与 pMD19(simple)-T 载体置于连接仪上  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  连接  $1.0\sim 3.0\text{ h}$ , 之后转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞(热转化法),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养  $6.0\sim 8.0\text{ h}$ , 挑取白色圆形单菌落, 菌

落 PCR 鉴定出阳性单克隆, 送测序, 得到碱基序列。

用 Vector NTI 预测基因序列的开放阅读框(ORF)区, 据此设计引物(*PvJ3*, 表 1), 重复上述实验过程, 最终测序得到雷竹 *PvJ3* 基因序列。运用 TMHMM 和 ProtScale 分析 *PvJ3* 蛋白的结构特征和理化性质; Smart 在线分析其蛋白的结构域; 通过 Clustal X2 比对雷竹 *PvJ3* 与其他物种中的 *J3* 同源基因的氨基酸序列的相似性; 并用 Mega 5.0 构建系统发育树, 选择邻近法(NJ), bootstrap 回复次数为 1 000 次。

1.4 组织特异性表达检测

用雷竹各组织部位的 cDNA 为模板, 通过实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR), 分析雷竹 *PvJ3* 基因的表达模式。根据实验要求设计目的基因的定量引物(*PvJ3*-1, 表 1), 毛竹的 *PeNTB* 基因作为内参基因<sup>[33]</sup>。各种雷竹组织做 3 次重复, 避光条件下操作, 参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>II(Takara)试剂盒要求加样。PCR 扩增程序(两步法): 预变性 95 ℃, 5 min; 95 ℃, 30 s; 60 ℃, 30 s, 循环数为 40。反应结束后, 分析确定数据的可靠性, 选择合适的数据, 用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>方法<sup>[34]</sup>对数据进行分析。

1.5 亚细胞定位

根据 *PvJ3* 基因 ORF 区序列(不含终止密码子)和 pCaM35S-sGFP 载体序列上的酶切位点, 在目的基因 ORF 区的上下游分别引入酶切位点 *SmaI* 和 *BamHI*, 设计引物(*PvJ3*-2, 表 1), 提取 pMD19-*PvJ3* 质粒做为模板, 进行 PCR 反应, 胶回收纯化得到带有酶切位点的基因片段与 pMD19(simple)-T 载体连接转化后, 阳性单克隆送测序。将测序正确的单克隆进行扩大培养, 用质粒提取试剂盒(上海生工生物公司)提取质粒, 用限制性内切酶 *SmaI* 和 *BamHI* 分别对 pMD19-*PvJ3* 和 pCaM35S-sGFP 载体质粒进行双酶切实验, 之后用 T4 DNA 连接酶在 16 ℃条件下过夜连接胶回收的酶切产物, 连接产物转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 经测序正确, 瞬时表达载体 *PvJ3*-GFP 构建成功。通过基因枪轰击洋葱 *Allium cepa* 表皮, 25 ℃下避光暗培养 1~2 d 后, 用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白信号, 金粉的准备和样品的制备参照文献<sup>[35]</sup>。

1.6 构建转基因过表达载体

根据 *PvJ3* 基因 ORF 区序列和 pC1301 载体(含有 35 S 启动子)的序列设计引物(*PvJ3*-3, 表 1), 在目的基因 ORF 区的上下游同样分别引入酶切位点 *SmaI* 和 *BamHI*, 构建过表达载体 pC1301-*PvJ3*, 实验方法参照 1.5 节。

1.7 拟南芥转基因植株检测

通过热转化法将构建成功的 pC1301-*PvJ3* 过表达载体转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态细胞中, 提取阳性单克隆的质粒, 重新转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 再次测序检验转入重组质粒是否正确。用已正确转入 pC1301-*PvJ3* 重组载体的农杆菌配制侵染液, 侵染进入花期的野生型拟南芥花序<sup>[36]</sup>, 侵染 3 次, 间隔约 1 周·次<sup>-1</sup>, 侵染后的拟南芥即 T<sub>0</sub> 代植株, 将消毒处理后的 T<sub>0</sub> 代种子均匀撒在加入潮霉素的 1/2 MS(Murashige and Skoog)固体培养基上, 潮霉素质量浓度为 100.00 mg·L<sup>-1</sup>, 按

表 1 本研究所用的引物

Table 1 PCR primers used in this study

| 引物名称            | 序列(5'→3')                        | 用途             |
|-----------------|----------------------------------|----------------|
| <i>J3-F</i>     | CTCTCCGTCTCACTCCGCTC             | 基因开放阅读框(ORF)扩增 |
| <i>J3-R</i>     | GTCAAATTGCCTTTATAGAA             |                |
| <i>PvJ3-F</i>   | ATGTTCTGGGCGCGCGCCG              | ORF 扩增         |
| <i>PvJ3-R</i>   | TTACTGTTGTGCGCACTGCAC            |                |
| <i>PvJ3-1-F</i> | CCGGAATTCTGGAGAGAGCATTAACG       | 荧光定量 PCR       |
| <i>PvJ3-1-R</i> | CCGGAATTCTTCTGTCTGGAGGAC         |                |
| <i>PeNTB-F</i>  | TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG          | 荧光定量 PCR 内参引物  |
| <i>PeNTB-R</i>  | AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT          |                |
| <i>PvJ3-2-F</i> | TCCCCCGGGATGTTTCGGGCGCGCG        | 亚细胞定位          |
| <i>PvJ3-2-R</i> | CGCGGATCCCTGTTGTGCGCACTGCACTC    |                |
| <i>PvJ3-3-F</i> | tccATCGATATGTTTCGGGCGCGCG        | 过表达载体构建        |
| <i>PvJ3-3-R</i> | cgcGGATcCttaCTGTTGTGCGCACTGCACTC |                |



照  $V(\text{潮霉素溶液}):V(1/2\text{MS 培养基})=1.50:1\ 000.00$  比例加入培养基中, 筛选抗性植株, 以采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[37]</sup>提取的抗性植株的基因组 DNA 为模板, PCR 鉴定出  $T_1$  代阳性植株, 并对植株表型进行初步统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因的克隆和序列分析

根据在毛竹转录组数据库中挑选的基因设计引物, 利用同源克隆的方法, 从雷竹中分离得到 1 个 *J3* 同源基因, 命名为 *PvJ3*, 分析 *PvJ3* 基因的碱基序列, 可知, 其 ORF 区由 1 260 bp 个碱基组成, 能编码 419 个氨基酸。经蛋白结构域和氨基酸序列分析(图 1~2), 可知 *PvJ3* 蛋白的 N 端有 J 蛋白家族典型的 J 结构域, 同时具有锌指结构域, C 末端有泛素化信号 CAQQ 序列。用 ClustalX2 软件对不同物种的 *J3* 同源蛋白的氨基酸进行序列比对, 结果发现: *J3* 蛋白在各类物种中的相似性很高, 与拟南芥 *J3* 蛋白的一致性可达 80.90%(图 2)。

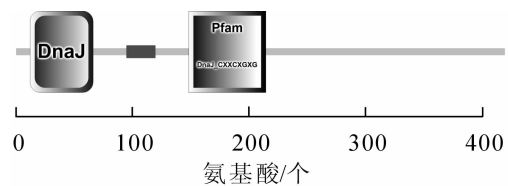


图 1 *PvJ3* 蛋白结构示意图

Figure 1 Structure diagram of *PvJ3*

采用临近法构建系统进化树, 结果显示: 雷竹 *J3* 蛋白与单子叶植物高粱 *Sorghum bicolor* 和玉米 *Zea mays* 的亲缘关系最近, 水稻 *Oryza sativa*, 大麦 *Hordeum vulgare* 和小麦 *Triticum aestivum* 次之, 与双子叶拟南芥和亚麻荠 *Camelina sativa* 的亲缘关系最远(图 3)。

### 2.2 组织特异性表达分析

通过 qRT-PCR 技术, 对同一竹鞭上开花和不开花雷竹中 *PvJ3* 基因在不同组织部位的表达水平进行分析。结果表明: *PvJ3* 基因在同一竹鞭的笋、花芽、花, 开花与不开花的茎秆、成叶、幼叶中均有表达。在开花雷竹的茎秆中 *PvJ3* 基因的表达量最高, 茎、花芽、花、幼叶和成叶中的表达依次降低。在不开花雷竹的茎秆中 *PvJ3* 基因的表达量同样也是最高, 幼叶、成叶中表达量基本一样(图 4)。

### 2.3 亚细胞定位结果分析

用基因枪轰击洋葱表皮细胞, 通过荧光显微镜观察瞬时表达载体 *PvJ3*-GFP 绿色荧光蛋白的信号, 确定 *PvJ3* 蛋白的定位情况(图 5)。pCaM35S-GFP 对照在整个洋葱细胞里均有荧光信号, 而 *PvJ3*-GFP 在细胞质核细胞核里有荧光信号, 因此推断 *PvJ3* 蛋白主要定位在细胞质和细胞核中。

### 2.4 *PvJ3* 基因在拟南芥中的过量表达分析

构建过表达载体 pC1301-*PvJ3* 转化野生型拟南芥收取  $T_0$  代种子, 潮霉素筛选抗性植株, 以抗性植株基因组 DNA 为模板, 经 PCR 检测得到  $T_1$  代拟南芥共 37 株。观察统计  $T_1$  代植株中长势较好的 30 株转基因植株的表型, 发现 *PvJ3* 基因的过表达植株开花时间明显早于野生型(图 6B)。统计结果显示: 转基因植株开花天数比野生型植株显著提早( $P=6.51\text{E}-15<0.01$ ), 平均提早 3.50 d(图 6C), 开花时莲座叶数目比野生型植株显著减少( $P=9.24\text{E}-09<0.01$ ), 平均减少 4.43 叶(图 6D), 且表现出多主茎现象(图 6A)。

## 3 讨论

高等植物成花过程存在多种诱导途径, 大量基因参与这些途径的调控, 成花关键基因的研究对于开花过程及花发育调控有着重要意义<sup>[38]</sup>。拟南芥中研究发现, *SOC1* 和 *FT* 是感知不同开花途径信号的整合因子, *SVP* 是直接调控 *FT* 和 *SOC1* 的转录调控因子<sup>[8,39]</sup>, *J3* 蛋白通过与 *SVP* 直接相互作用而衰减 *SVP* 与 *SOC1* 和 *FT* 调控序列的结合从而上调 *SOC1* 和 *FT* 的表达量, 参与拟南芥的成花过程, 这一发现使得拟南芥成花调控网络更加完善<sup>[15]</sup>。本研究成功从雷竹中克隆得到 *J3* 同源基因并命名为 *PvJ3*, 雷竹 *PvJ3* 所编码的氨基酸序列与拟南芥 *J3* 蛋白氨基酸序列一致性达 80.90%, 对其蛋白结构域分析可知, *PvJ3* 拥有相对保守的 J 结构域以及锌指结构域, 可以说明 *PvJ3* 属于 J 家族中的一员。

为了研究雷竹 *PvJ3* 蛋白的功能, 本研究通过 qPCR 技术和亚细胞定位分析该蛋白在雷竹中的表达模式和表达部位。对雷竹 *PvJ3* 基因进行了不同组织部位特异性表达分析, 结果显示雷竹 *PvJ3* 基因在同一竹鞭的不同组织部位都有表达, 已发现双子叶植物拟南芥 *J3* 基因同样在根、茎、叶、花芽、花和果实等不同组织中表达<sup>[29]</sup>, 说明 *J3* 基因在单双子叶植物中均表现出全株表达的现象。在相对表达量上,

|                                 |                                                                                                |     |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Zea mays</i>                 | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGS..H | 88  |
| <i>Sorghum bicolor</i>          | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGA..H | 88  |
| <i>Oryza sativa</i>             | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGS..H | 88  |
| <i>Phyllostachys violascens</i> | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGA..H | 88  |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGGG   | 89  |
| <i>Triticum aestivum</i>        | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGH..  | 87  |
| <i>Cicer arietinum</i>          | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G | 88  |
| <i>Vitis vinifera</i>           | MFGRAP..RKSDNTKYIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G | 88  |
| <i>Camelina sativa</i>          | MFGRGSRKSDNTKFIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G   | 89  |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | MFGRGSRKSDNTKFIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G   | 89  |
| <i>Eutrema salsugineum</i>      | MFGRGSRKSDNTKFIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G   | 89  |
| <i>Capsella rubella</i>         | MFGRGSRKSDNTKFIYELGVPRKASQDDLKKAIRKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAAQAYEVLSDPKEKREIYDQYGEDALKEGUGGGGG..G   | 89  |
| <i>Zea mays</i>                 | VDPFDFISFFFG...PSFG..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVICSKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Sorghum bicolor</i>          | VDPFDFISFFFG...PSFG..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVICSKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Oryza sativa</i>             | VDPFDFISFFFG...PSFG..GGG..SSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV   | 173 |
| <i>Phyllostachys violascens</i> | VDPFDFISFFFG...PSFG..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVICSKCKGKSGKSGASMTCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | VDPFDFISFFFG...PSFGGGGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV      | 176 |
| <i>Triticum aestivum</i>        | HDPFDFISFFFGGGNPF..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV       | 175 |
| <i>Cicer arietinum</i>          | HDPFDFISFFFG...NHFG..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Vitis vinifera</i>           | HDPFDFISFFFG...SPTA..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVICSKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Camelina sativa</i>          | HDPFDFISFFFG...PFG..GG..SSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | HDPFDFISFFFG...PFG..GN..TSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 174 |
| <i>Eutrema salsugineum</i>      | HDPFDFISFFFG...PFG..GGGSSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV      | 175 |
| <i>Capsella rubella</i>         | HDPFDFISFFFGGGHPFG..GG..SSRRRRRRRGGDVVHPLKVSLEDLYNGTSKKLSLSRNVLCCKCKGKSGKSGASMRCPGCGGSGMRV     | 176 |
| <i>Zea mays</i>                 | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Sorghum bicolor</i>          | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Oryza sativa</i>             | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 263 |
| <i>Phyllostachys violascens</i> | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 266 |
| <i>Triticum aestivum</i>        | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 265 |
| <i>Cicer arietinum</i>          | SIRHLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Vitis vinifera</i>           | SIRHLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Camelina sativa</i>          | SIRHLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | SIRHLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 264 |
| <i>Eutrema salsugineum</i>      | TIROLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 265 |
| <i>Capsella rubella</i>         | SIRHLGPSMIQMQPQPCNECRGTGESINEKDRCPGCKGKVKVQKKVLEVVHVEKGMQHNQKITTFPGADEAPDVTGDIQFVLQQRDHSK      | 266 |
| <i>Zea mays</i>                 | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Sorghum bicolor</i>          | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Oryza sativa</i>             | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 353 |
| <i>Phyllostachys violascens</i> | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 356 |
| <i>Triticum aestivum</i>        | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 355 |
| <i>Cicer arietinum</i>          | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Vitis vinifera</i>           | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Camelina sativa</i>          | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 354 |
| <i>Eutrema salsugineum</i>      | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 355 |
| <i>Capsella rubella</i>         | FKRKGDDLFEYHTLSLSTEALCGFCFVLTHLDNRQLLKSMPGEVVKPDQFKAINDEGMPYQRPFMKGKLYIHFTVDFPDSLAPDQCKAL      | 356 |
| <i>Zea mays</i>                 | ETVLPFRSSSKLTDMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYE..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                        | 418 |
| <i>Sorghum bicolor</i>          | ETVLPFRSSSKLTDMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYE..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                        | 418 |
| <i>Oryza sativa</i>             | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 416 |
| <i>Phyllostachys violascens</i> | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYE..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 418 |
| <i>Hordeum vulgare</i>          | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 421 |
| <i>Triticum aestivum</i>        | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 419 |
| <i>Cicer arietinum</i>          | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 417 |
| <i>Vitis vinifera</i>           | ETVLPARATQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYE..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                        | 416 |
| <i>Camelina sativa</i>          | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 419 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>     | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 419 |
| <i>Eutrema salsugineum</i>      | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 420 |
| <i>Capsella rubella</i>         | ETVLPFKPASQLTDEMEIDECEETTHMDVNNIEEEMRRKQAHAACEAYD..EDD..EMPFGG..AQRVQCAQ                       | 420 |

图2 *PvJ3* 与其同源基因的氨基酸序列比对Figure 2 Alignment of the *PvJ3* amino acid sequences from different plant species

*PvJ3* 基因在开花雷竹茎秆中表达量最高, 在花芽和花中的表达量降低, 这与已报道的拟南芥中 *J3* 基因在花中表达量最高<sup>[15]</sup>的结果存在差异。*PvJ3* 蛋白亚细胞定位结果显示该蛋白定位在细胞质和细胞核, 与拟南芥中 *J3* 蛋白的亚细胞定位结果相一致<sup>[15]</sup>, 拟南芥中和 *J3* 蛋白具有互作关系的 SVP, SOC1 和 FT 蛋白都是核蛋白, 说明雷竹 *PvJ3* 可能在细胞核中与这些开花整合因子相互作用, 从而对开花途径进行调控。

将 *PvJ3* 基因导入野生型拟南芥植株验证其功能,  $T_1$  代转基因植株的表型统计结果表明: 转基因拟南芥植株开花时间明显早于野生型植株, 开花时莲座叶数量明显减少(图 6 C, 图 6D), 而拟南芥 *J3* 基因的过表达植株和野生型植株的开花时间并没有明显差别<sup>[15]</sup>, 这说明雷竹 *PvJ3* 基因可以显著影响花期,



可能是一个开花促进因子。值得注意的是，转雷竹 *PvJ3* 基因拟南芥植株同时表现出多主茎现象(图 6A)，这一现象在拟南芥 *J3* 过表达植株中并没有被观测到<sup>[15]</sup>。以上结果表明，雷竹 *PvJ3* 基因不仅在成花调控中的功能和拟南芥 *J3* 基因存在一定差异，同时还可能参与茎的发育等其他生长发育过程，在基因功能上比拟南芥同源基因要复杂的多。

目前，*J3* 基因功能的有关研究主要以模式植物拟南芥为研究对象，单子叶植物中还未见报道。通过对比 *J3* 基因在雷竹和拟南芥中的表达模式不难发现：雷竹 *PvJ3* 基因和拟南芥 *J3* 基因都是全株表达，同时编码蛋白都定位在细胞质和细胞核，这表明 *J3* 基因在不同植物中的表达部位不存在明显差异，并且可能是一个核内作用蛋白。在相对表达量上，雷竹 *PvJ3* 基因和拟南芥 *J3* 基因存在一定差异，同一竹鞭上开花和不开花雷竹中 *PvJ3* 基因在茎秆中表达量最高，而拟南芥中 *J3* 基因表达量在花中最高，这可能与雷竹 *PvJ3* 基因参与茎的发育有关。转基因实验的结果表明：雷竹 *PvJ3* 基因不仅可以显著提早拟南芥开花时间，同时还促使拟南芥出现多主茎现象，这表明雷竹 *PvJ3* 基因很可能参与除了开花调节以外的其他生长发育过程的调控。由于拟南芥和竹子之间的差异很大，雷竹 *PvJ3* 基因在竹子中是否可以促进植物提早开花，同时还参与哪些生物学过程，需要后续研究进一步验证。

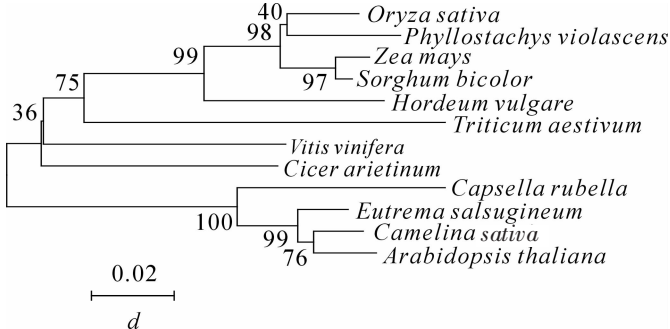


图 3 不同物种 J3 蛋白的系统进化树分析  
Figure 3 Phylogenetic tree analysis of J3 in different plant species

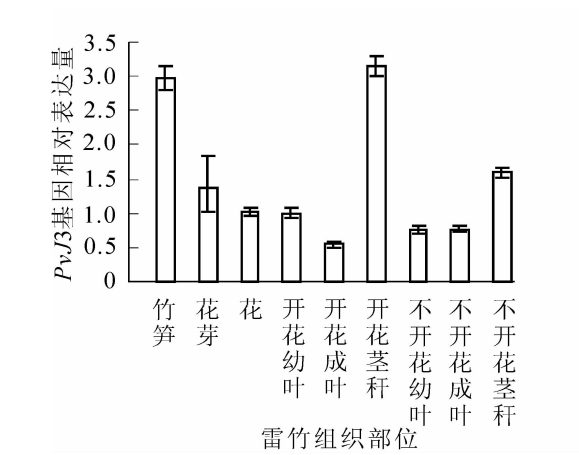


图 4 *PvJ3* 在开花雷竹与不开花雷竹的不同部位表达水平

Figure 4 Expression of *PvJ3* in different tissues of *Phyllostachys violascens*

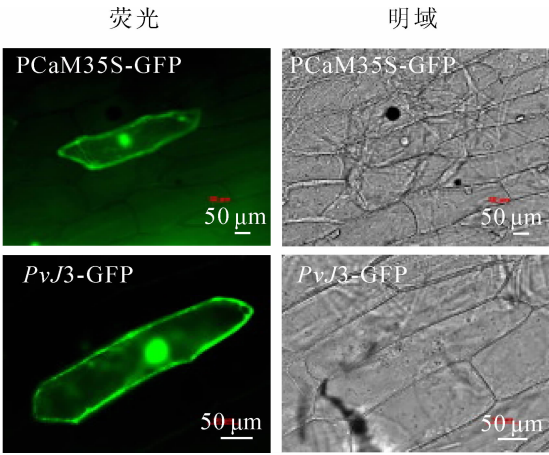
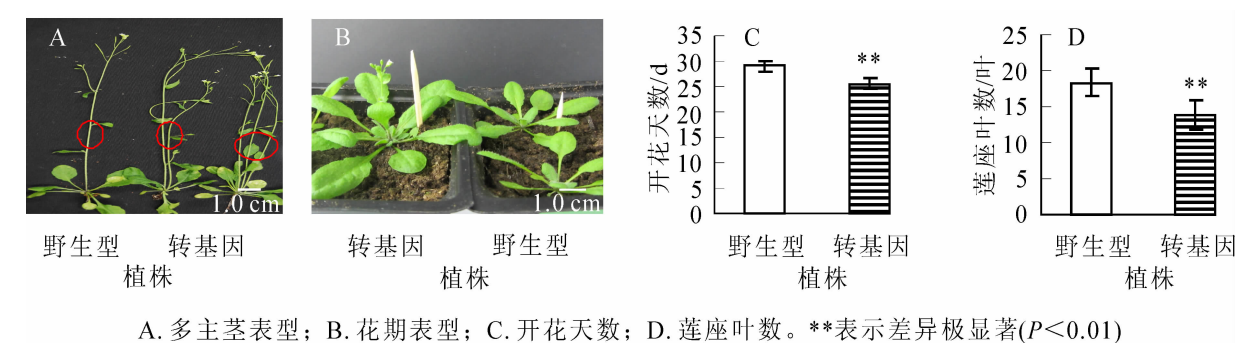


图 5 *PvJ3* 蛋白亚细胞定位结果

Figure 5 Subcellular localization of *PvJ3* fusion protein



A. 多主茎表型；B. 花期表型；C. 开花天数；D. 莲座叶数。\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )

图 6 *PvJ3* 过表达拟南芥 T<sub>1</sub> 植株表型

Figure 6 Phenotypes of the *PvJ3* transgenic *Arabidopsis thaliana* in T<sub>1</sub> generation

#### 4 参考文献

- [1] QUESADA V, DEAN C, SIMPSON G G, *et al.* Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering [J]. *Int J Dev Biol*, 2005, **49**(5/6): 773 – 780.
- [2] SIMPSON G G, DEAN C. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time ? [J]. *Science*, 2002, **296**(5566): 285 – 289.
- [3] LIU Chang, CHEN Hongyan, HONG Linger, *et al.* Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2008, **135**(8): 1481 – 1491.
- [4] DENNIS E S, PEACOCK W J. Epigenetic regulation of flowering [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, **10**(5): 520 – 527.
- [5] BOSS P K, BASTOW R M, MYLNE J S, *et al.* Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(suppl): S18 – S31.
- [6] WANG Cunxi, TIAN Qing, HOU Zhenglin, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* AT PRP39-1 gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein with similarity to the yeast pre mRNA processing protein PRP39, affects flowering time [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, **26**(8): 1357 – 1366.
- [7] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(suppl): S111 – S130.
- [8] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Gen*, 2013, **45**(4): 456 – 461.
- [9] TORTI S, FORNARA F. AGL24 acts in concert with SOC1 and FUL during *Arabidopsis* floral transition [J]. *Plant Sign Behav*, 2012, **7**(10): 1251 – 1254.
- [10] NAVARRO C, CRUZ-ORÓ E, PRAT S. Conserved function of FLOWERING LOCUS T (FT) homologues as signals for storage organ differentiation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, **23**(1): 45 – 53.
- [11] YAMASHINO T, YAMAWAKI S, HAGUI E, *et al.* Clock-controlled and FLOWERING LOCUS T (FT)-dependent photoperiodic pathway in *Lotus japonicus* I: verification of the flowering-associated function of an FT homolog [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, **77**(4): 747 – 753.
- [12] NAKANO Y, HIGUCHI Y, YOSHIDA Y, *et al.* Environmental responses of the FT/TFL1 gene family and their involvement in flower induction in *Fragaria × ananassa* [J]. *J Plant Physiol*, 2015, **177**(24): 60 – 66.
- [13] LEE J, LEE I. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator [J]. *J Exp Bot*, 2010, **61**(9): 2247 – 2254.
- [14] LEE J H, YOO S J, PARK S H, *et al.* Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 2007, **21**(4): 397 – 402.
- [15] SHEN Lisha, KANG Y G G, LIU Lu, *et al.* The J-domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(2): 499 – 514.
- [16] RAJAN V, D'SILVA P. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors [J]. *Funct Int Genom*, 2009, **9**(4): 433 – 446.
- [17] MIERNYK J A . The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones [J]. *Cell Stress Chap*, 2001, **6**(3): 209 – 218.
- [18] QIAN Yanqiu, PATEL D, HARTL F U, *et al.* Nucleic magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain [J]. *J Mol Biol*, 1996, **260**(2): 224 – 235.
- [19] CRAIG E A, HUANG P, ARON R, *et al.* The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2006, **156**(1): 1 – 21.
- [20] MARTINEZ-YAMOUT M, LEGGE G B, ZHANG Ouwen, *et al.* Solution structure of the cysteine-rich domain of the *Escherichia coli* chaperone protein DnaJ [J]. *J Mol Biol*, 2000, **300**(4): 805 – 818.
- [21] MIERNYK J A. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones [J]. *Cell Stress Chap*, 2001, **6**(3): 209 – 218.
- [22] SALAS-MUÑOZ S, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ A A, ORTEGA-AMARO M A, *et al.* *Arabidopsis* AtDjA3 null mutant shows increased sensitivity to Absciscic acid, salt, and osmotic stress in germination and post-germination stages [J]. *Plant Sci*, 2016, **7**(2): 220. doi:10.3389/fpls.2016.00220.
- [23] VITHA S, FROELICH J E, KOKSHAROVA O, *et al.* ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolu-

- tionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2 [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1918 – 1933.
- [24] CHEN Kunming, HOLMSTROM M, RAKSAJIT W, *et al.* Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**(1): 43. doi: 10.1186/1471-2229-10-43.
- [25] SHIMADA H, MOCHIZUKI M, OGURA K, *et al.* *Arabidopsis* cotyledon-specific chloroplast biogenesis factor CYO1 is a protein disulfide isomerase [J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(10): 3157 – 3169.
- [26] SEKI M, NARUSAKA M, ABE H, *et al.* Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**(1): 61 – 72.
- [27] CHAI Tuanyao, ZHANG Yuxiu, ZHAO Wenming. Cloning of cDNA and expression analysis of DnaJ-like gene under heavy metal stress in bean [J]. *Progr Nat Sci*, 2000, **10**(2): 135 – 140.
- [28] SEDBROOK J C, CHEN Rujin, MASSON P H. *ARG1* (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(3): 1140 – 1145.
- [29] GUAN Changhui, ROAEN E S, BOONSIRICHAH K, *et al.* The *ARG1-LIKE2* gene of *Arabidopsis* functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the *PGM* pathway [J]. *Plant Physiol*, 2003, **133**(1): 100 – 112.
- [30] THEIßEN G, KIM J T, SAEDLER H. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes [J]. *J Mol Evol*, 1996, **43**(5): 484 – 516.
- [31] WIGGE P A, KIM M C, JAEGER K E, *et al.* Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2005, **309**(5737): 1056 – 1059.
- [32] de CARVALHO A L, NELSON B W, BIANCHINI M C, *et al.* Bamboo-dominated forests of the southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e54852. doi: 10.1371/journal.pone.0054852.
- [33] 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[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(1): 48 – 52.
- QI Feiyan, HU Tao, PENG Zhenhua, *et al.* Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in moso bambo [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2013, **33**(1): 48 – 52.
- [34] 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.
- [35] 王小利, 吴佳海, 刘晓霞, 等. 高羊茅春化基因 *FaVRN1* 亚细胞定位与差异表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, **30**(2): 152 – 158.
- WANG Xiaoli, WU Jiahai, LIU Xiaoxia, *et al.* Subcellular localization and differential expression analysis of vernalization gene *FaVRN1* in tall fescue [J]. *Genomics Appl Biol*, 2011, **30**(2): 152 – 158.
- [36] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 1998, **16**(6): 735 – 743.
- [37] 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.
- GAO Zhimin, FAN Shaohui, GAO Jian, *et al.* Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, **19**(6): 725 – 728.
- [38] 张素芝, 左建儒. 拟南芥开花时间调控的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(4): 301 – 309.
- ZHANG Suzhi, ZUO Jianru. Advance in the flowering time control of *Arabidopsis* [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(4): 301 – 309.
- [39] LI Dan, LIU Chang, SHEN Lisha, *et al.* A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2008, **15**(1): 110 – 120.