毛竹BBM基因家族的鉴定及表达模式分析

许若彤 周明兵*

(浙江农林大学竹子研究院,杭州 311300)

摘要 BBM(BABY BOOM)转录因子在诱导植物体胚发生、促进细胞增殖与再生、提高遗传转化效率方面具有重要作用,常被应用于提高植物遗传转化效率。该研究利用生物信息学方法,系统鉴定了毛竹(Phyllostachys edulis) BBM家族成员,分析了系统进化关系、启动子调控元件、编码蛋白的理化性质、基因结构、蛋白质氨基酸保守序列,它们在染色体上的位置以及其蛋白二、三级结构;通过荧光定量PCR分析PeBBMs基因在不同组织器官中的表达模式。在毛竹中共鉴定出6个BBM家族基因,分布在6条不同染色体上。毛竹BBM蛋白编码486~699个氨基酸,等电点范围为6.31(PeBBM2)~8.92(PeBBM3)。毛竹BBM蛋白的二级结构预测表明:无规则卷曲和α-螺旋占比最高约80%。系统进化树表明,PeBBMs都聚类在AP2家族,亚细胞定位预测结果表明,毛竹BBM蛋白 大部分位于细胞核,小部分位于细胞质。顺式作用元件分析表明,毛竹BBM的转录表达可能与非生物胁迫、光反应和转录调控相关。实时定量RT-PCR结果表明,PeBBM基因表达存在组织差异性,说明该基因家族不同成员在毛竹生长发育过程中发挥着不同的作用,其中PeBBMs在愈伤组织再生植株中相对表达量最高。推测PeBBMs可能参与毛竹愈伤组织再生过程的调控,该研究为深入研究毛竹BBM家族基因的功能奠定了基础。

关键词 BBM家族; 表达分析; 毛竹; 再生

Identification and Expression Pattern Analysis of BBM Family Genes of *Phyllostachys edulis*

XU Ruotong, ZHOU Mingbing*

(Bamboo Industry Institute, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract BBM (BABY BOOM) transcription factors have important roles in inducing plant somatic embryogenesis, promoting cell proliferation and regeneration, and improving the efficiency of genetic transformation, and are often applied to improve the efficiency of plant genetic transformation. With the employment of the bioinformatics, this study identified the BBM family members of moso bamboo, and analyzed the phylogenetic relationships. The promoter regulatory elements, physicochemical properties of encoded proteins, gene structures, amino acid conserved sequences of proteins, positions in chromosomes, and their protein secondary and tertiary structures were analyzed; the expression pattern of moso bamboo BBM family members in different tissues and callus regeneration process was analyzed by real-time quantitative RT-PCR. A total of six BBM family genes were identified in *Phyllostachys edulis*, which were distributed on six different chromosomes. The BBM protein of moso bamboo encodes 486-699 amino acids, and its isoelectric point ranges from 6.31 (*PeBBM2*) to 8.92

收稿日期: 2024-04-27 接受日期: 2024-05-28

浙江自然科学基金(批准号: LZ24C160002)资助的课题

^{*}通信作者。Tel: 13588152716, E-mail: zmbin@163.com

Received: April 27, 2024 Accepted: May 28, 2024

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LZ24C160002)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-13588152716, E-mail: zmbin@163.com

(*PeBBM3*). Secondary structure prediction of BBM proteins showed that irregular coiled and α -helices accounted for up to about 80%. The phylogenetic tree showed that the *PeBBMs* were all clustered in the AP2 family, indicating that the *BBMs* of moso bamboo belonged to the AP2 family. The results of subcellular localization prediction showed that most of moso bamboo BBM proteins were located in the nucleus and the rest in the cytoplasm. Cis-acting element analysis indicated that the transcriptional expression of moso bamboo *BBM* might be associated with abiotic stress, light response and transcriptional regulation. Real-time quantitative RT-PCR results showed that there was tissue variability in the expression of the *PeBBM* gene, indicating that different members of the gene family played different roles in the growth and development of moso bamboo, with *PeBBMs* having the highest relative expression in callus regeneration process. It was hypothesized that *PeBBMs* might be involved in the process of moso banboo regeneration process. The results of this study laid a certain foundation for the in-depth study of the function of BBM family genes in moso bamboo.

Keywords BBM family; expression pattern analysis; *Phyllostachys edulis*; regeneration

毛竹(Phyllostachys edulis, P. edulis) AP2/ERF转录 因子家族根据进化关系分析可被划分为3个亚家族: AP2、RAV和ERF。BBM(BABY BOOM)转录因子属 于AP2家族^[1,2],这是一个具有AP2/ERF结构域的超大 植物基因家族^[1],在调节植物的生长发育和响应胁迫 过程中发挥着非常重要的作用。BBM基因最初是从 甘蓝型油菜(Brassica napus)未成熟的花粉粒中分离而 来的,异位表达该基因不仅能促进甘蓝型油菜和拟南 芥(Arabidopsis thaliana)的细胞增殖和形态发生,而且 在不添加任何外源激素的情况下,可成功诱导体胚的 发生^[3]。在单子叶植物中,过表达BBM可以提高遗传 转化效率^[4],在光皮桦(Betula luminifera)中BBM起到 了调控愈伤组织形成和不定根发生的双重作用^[5],在 陆地棉(Gossypium hirsutum)中BBM起到了调控胚胎 发育的功能^[6]。在毛白杨(Populus tomentosa Carière) 中BBM起到了调控胚性愈伤增殖的作用^[7]。在小麦 (Triticum aestivum L.)和玉米(Zea mays L.)中BBM可 以促进胚胎再生从而影响其转化效率^[8]。在玉米中 BBM和 WUS的联合过表达可以促进成熟胚胎的转 化^[9]。在犬蔷薇(Rosa canina)中, 过表达RcBBM可以 同时促进以叶和根为外植体再生芽^[10]。综上所述, BBM在诱导植物体胚发生、促进细胞增殖与再生、 提高遗传转化效率和诱导无融合生殖等方面具有重 要作用[11],是胚胎特有的基因或胚胎发生的标志基 因之一[12]。

毛竹隶属于禾本科(Grammineae)竹亚科 (Bambusoideae)刚竹属(Phyllostachys),是我国分布 范围最广、生长最快、应用最广泛的经济竹种。目 前在毛竹中共鉴定出116个AP2/ERF转录因子家族 成员^[13],研究表明,AP2/ERF转录因子参与植物生长 发育、花发育、果实发育、种子发育,以及机械伤 害、病菌侵害、高盐、干旱、低温等生物与非生 物胁迫响应等多种生物学过程^[13]。但研究人员未对 毛竹AP2/ERF转录因子家族内的BBM亚家族进行系 统地鉴定分析。目前已经从模式植物拟南芥^[14]、水 稻^[15]、犬蔷薇^[10]、甘蓝型油菜^[13]、玉米^[16]、鳞状苜 蓿^[17]和大豆^[18]中鉴定出具有功能的BBM基因家族成 员。本研究利用生物信息学方法鉴定毛竹BBM家族 成员,分析其基因启动子、蛋白质理化性质、基因结 构、氨基酸保守基序、基因在染色体的位置,预测其 蛋白二、三级结构以及基因在组织器官和愈伤组织 再生过程中表达特异性等,为探索BBM家族对毛竹 再生的影响奠定基础,也为深入解析毛竹BBM家族 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毛竹BBM基因家族的鉴定和筛选

水稻、小麦和玉米^[19]BBM家族基因的氨 基酸序列分别下载于Rice Genome Annotation Project(http://rice.uga.edu/)和Phytozome(https:// phytozome-next.jgi.doe.gov/)数据库。从毛竹基因组 数据库(bamboo.bamboogdb.org)下载毛竹基因组序 列、编码序列(coding sequences, CDS)、基因组GFF 注释文件和氨基酸序列^[20-21]。进行本地BlastP比对 (*E*-value<1×10⁻⁵,相似性>80%),输出最优比对结果。 根据毛竹比对区域不低于氨基酸序列长度的1/2,输 出最优比对结果,筛选毛竹候选*BBM*基因序列,最终 得到毛竹*BBM*基因^[22-23],确定获取的候选序列的保 守结构域的准确性和完整性,保留编码完整保守结构域的候选序列,并进行基因命名(PeBBMs)。

1.2 毛竹BBM的生物信息学分析

利用 ExPAXy(https://www.expasy.org/)网站分 析 BBM蛋白质的相对分子量、等电点、氨基酸 数目等参数。利用 Gene Structure Display Server 2.0(http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)在线工具分析 BBM的 基因结构,然后利用 MEME(http://meme-suite.org/) 对 BBM蛋白序列进行保守基序的在线分析 (参数设 置,重复次数:任意;最大 motif数:30;最适 motif宽 度:6至200个残基之间)^[24],然后采用TBtools(https:// github.com/CJ-Chen/TBtools)对基因结构和基序分 析结果进行可视化^[25]。对 PeBBM二级结构特征 采用在线软件 SOPMA[NPS@: SOPMA secondary structure prediction (ibcp.fr)]进行预测分析;使用在线 网站 Swiss-Model(https://swissmodel.expasy.org/)构建 PeBBM蛋白的三级结构模型。

1.3 BBM系统进化树的构建与分析

采用MEGA7.0软件中的Clustal Muscle模块 对毛竹、拟南芥、鳞状苜蓿、犬蔷薇、玉米、大 豆和水稻的CD-PKs进行多序列比对,采用邻接 法(neighbor-joining, NJ)生成无根进化树,校验参 数Bootstrap设置重复1000次^[26]。利用在线工具 Evolview(https://www.evolgenius.info/evolview/)进行 树图编辑^[27]。

1.4 毛竹BBM基因的染色体分布

使用 TBtools软件的 Gene Location Visualize from GTF/GFF工具预测毛竹 *BBM*基因在染色体上的位置^[28-29]。

1.5 毛竹BBM基因表达模式分析

以室内培养的盆栽毛竹实生苗为材料,培养 条件:温度为18~25°C,光周期为16h光照/8h黑暗, 光强为250~350 µmol/ms。将毛竹未成熟胚消毒, 诱导合子胚膨大,愈伤化后与外植体分离,转移至 含有2,4-D的愈伤继代培养基中继续培养,每隔30 天更换一次培养基,当继代培养至3个月时,根据毛 竹愈伤组织颜色、质地、形态特征将其分为2种类 型:白色半透明型和黄色致密型。待新生毛竹实生 苗长至2个月大小时,收集叶片、茎、根、芽、未 成熟合子胚诱导的两种类型的愈伤组织,愈伤组织 再生植株,愈伤组织分化出的芽点和愈伤组织分 化出的根,用液氮速冻后,置于-80°C保存^[30]。用 Trizol法提取上述材料的 RNA,采用反转录试剂盒 方法合成毛竹 cDNA,于-20 °C保存备用。将反转 录得到的 cDNA样品稀释后作为模板进行 PCR扩 增。采用定量 RT-PCR分析 *BBM*基因的组织表达特 异性^[31]。同时以 *PeActin*基因为内参基因^[32]。PCR 反应体系(15 μL):上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, cDNA模板3 μL, 2× HLingene PCR Master Mix 7.5 μL 和ddH₂O 2.5 μL。PCR 扩增程序:95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 退火(温度以各自引物最佳温度为准) 30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环; 72 °C延伸5 min。每个 模板设置3次重复。利用2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量, 绘制不同基因的表达模式图^[2]。

2 结果与分析

2.1 毛竹BBM基因家族基因鉴定、基本理化特征分析及蛋白二级结构分析

从毛竹全基因组中筛选得到6个BBM基因,将 其分别命名为BBM1~6。生物信息学结果显示,毛 竹最长的BBM蛋白(PeBBM2)包含699个氨基酸,分 子量达到73 059.88 kDa; 最短的BBM蛋白(PeBBM3) 仅包含486个氨基酸,分子量为51 740.95 kDa;等电 点范围为6.31(PeBBM2)~8.92(PeBBM3)。亚细胞 定位预测结果表明, PeBBM2和PeBBM3蛋白位于 细胞核和细胞质中, PeBBM1、PeBBM4、PeBBM5 和PeBBM6蛋白位于细胞核中(表1)。基因结构分 析显示,毛竹BBM家族基因多数含7~8个内含子 (coding sequence), 在所有毛竹 BBM中, PeBBM1内 含子区域最长, PeBBM3内含子区域最短(图1)。保 守基序分析显示: PeBBM含有10个保守基序,将其 分别命名为motifl~motif10。其中有5个基序高度保 守,分别是motif1~3、motif5和motif8,其他基序在 部分序列中缺失。PeBBM2和PeBBM3缺失motif10, PeBBM1、PeBBM3和PeBBM6缺失motif9。

毛竹 PeBBM蛋白的二级结构预测(表 2)表明: PeBBM蛋白的二级结构均含有α-螺旋、β-折叠、延 伸链和无规则卷曲,不同结构占比从大到小依次为 无规则卷曲、α-螺旋、延伸链、β-折叠。其中,β-折 叠占比最小,均在6%以下;延伸链占比为12%~15%; α-螺旋占比为22%~32%;无规则卷曲占二级结构总 量的53%~62%。毛竹 PeBBM蛋白的三级结构预测 表明, PeBBM蛋白质无规律的松散结构占比较大(图 2)。

2.2 毛竹BBM家族系统进化树的构建与分析

为了确定*BBM*基因的进化关系,预测基因潜在功能,下载拟南芥2个^[14]、水稻4个^[15]、玉米1个^[16]、

犬蔷薇2个^[10]、鳞状苜蓿1个^[33]、甘蓝型油菜2个^[13] 和大豆1个^[18]BBM基因CDS序列进行多重序列比对, 并利用MEGA软件根据邻接法构建进化树^[34]。根

基因名称	基因ID	引物序列(5'→3')		产物长度/bp
Gene name	Gene ID	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	1 m /°C	Product length /bp
PeBBM1	Ph02Gene09470.t1	F: CCG TAA TCG TGG GAG CCA TCA AC	65	142
		R: GTC TCA ATG TCG CCG ACC AAC TC		
PeBBM2	Dh02Cara20822 +1	F: GAA GTG GGA CGC CGT TGA GAA C	65	116
	F1102Oene29855.11	R: GAA GGA GAG GCA CGG AGT TGA		
PeBBM3	Ph02Gene/17535 t1	F: GAA GTG GGA CGC CGT TGA GAA C	65	117
	F11020ene47555.t1	R: GGA AGG AGA GGC ACG GAG TTG A		
PeBBM4	Dh02Cono06628 t1	F: GGC TCT CGC TCT CCA TGA ACA TG	65	155
	F11020e11e00028.t1	R: ACT GCC ACC GCC ATC ATC CTT		
PeBBM5	Ph02Cono/2801 +1	F: GAG AGC ACC TCG TCG GAG AAC A	65	245
	Ph02Gene42801.11	R: CTT GCT GCC TTG TCC TCC TTG TC		
PeBBM6	Ph02Gene27330.t1	F: AGC ACC GCC ACC CAG AAC TT	65	230
		R: CCA CCG CCA ACC AGA CAA TCT C		

表1 毛竹*BBM*基因的RT-qPCR引物 Table 1 Specific primers for RT-qPCR of *BBM* genes in *P. edulis*

表2 毛竹BBM家族基因编码蛋白序列的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of proteins encoded by BBM gene family in P. edulis

基因名称	基因ID	氨基酸数目	分子量/kDa	等电点	亚细胞定位	结构域分析
Gene name	Gene ID	Amino acid number	Molecular weight /kDa	Isoelectric point	Subcellular localisa-	Structural do-
					tion	main analysis
PeBBM1	Ph02Gene09470.t1	693	73 056.02	6.25	Nucleus	AP2
PeBBM2	Ph02Gene29833.t1	699	73 059.88	6.31	Cytoplasm, nucleus	AP2
PeBBM3	Ph02Gene47535.t1	486	51 740.95	8.92	Cytoplasm, nucleus	AP2
PeBBM4	Ph02Gene06628.t1	661	69 676.08	5.52	Nucleus	AP2
PeBBM5	Ph02Gene42801.t1	677	71 757.48	6.14	Nucleus	AP2
PeBBM6	Ph02Gene27330.t1	551	59 120.35	6.06	Nucleus	AP2



图1 毛竹BBM家族基因结构

Fig.1 Structures analysis of BBM gene family in P. edulis

表3	毛竹PeBBM蛋白二级结构分析
----	-----------------

Table 5 Secondary structure analysis of Pebbyl proteins in P.

		, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	1	
蛋白名称	α-螺旋/%	β-折叠/%	延伸/%	无规则卷曲/%
Protein name	α-helix /%	β-sheets /%	Extended strand 1%	Disordered regions /%
PeBBM5	22.01	2.66	14.03	61.30
PeBBM3	27.37	4.73	12.76	55.14
PeBBM2	28.90	2.86	12.16	56.08
PeBBM4	23.90	3.18	13.01	59.91
PeBBM1	31.17	4.18	12.70	54.95
PeBBM6	27.95	5.08	13.25	53.72

据系统发育分析将拟南芥、水稻、玉米、犬蔷薇、 鳞状苜蓿、甘蓝型油菜、大豆和毛竹的BBM分为3 个分支, PeBBM3、PeBBM4和PeBBM5与水稻中的 OsBBM2和OsBBM4聚类在一起, PeBBM1、PeBBM2 和PeBBM6被分在另一分支中,相比于拟南芥,毛竹 BBM均优先与水稻BBM基因聚类(图3)。



图3 毛竹、拟南芥、鳞状苜蓿、甘蓝型油菜、犬蔷薇、玉米、大豆和水稻BBM家族系统进化树 Fig. 3 Evolutionary tree of BBM family in *P. edulis, Arabidopsis, Squamata*, canine rose, maize, soybean and *Oryza sativa*

2.3 毛竹BBM家族基因启动子顺式作用元件分析

为探究 PeBBM受内在调控因子调控的情况和 对外界环境的响应,选取 PeBBM距离转录起始位点 上游2000 bp的序列,对其所含顺式作用元件和应 答元件进行分析(图4)。如图3所示,所有 PeBBM启 动子的顺式作用元件种类比较相似,包括有MYB转 录因子结合的顺式作用元件,生长素、赤霉素、水 杨酸、脱落酸等激素响应元件以及低温、干旱、缺 氧、光等非生物胁迫响应元件。非生物胁迫、光 反应和转录调控相关元件为大多数毛竹 BBM基因 所有。

2.4 毛竹BBM基因家族染色体定位分析

根据毛竹基因组GFF文件定位6个BBM基因。

结果(图5)显示,6个毛竹BBM基因分布在6条染色体上,23号、16号、13号、14号、17号和3号染色体上各分布1个BBM基因。

2.5 毛竹BBM基因家族的表达模式分析

对6个BBM基因设计特异性的RT-PCR定量引物观察BBM基因在不同组织中的表达模式(表3),本研究在新生毛竹实生苗长至2个月大小时,取叶、茎、根、芽以及未成熟合子胚诱导的两种类型的愈伤组织、愈伤组织再生植株、愈伤组织分化出的芽点、愈伤组织分化的根(图6)。在植物组织培养过程中,愈伤组织表现为多种不同的状态,通过观察愈伤的颜色、质地、形状大小可将其进行分类,适宜状态的愈伤组织有利于愈伤组织增殖及提高



图4 毛竹BBM家族基因启动子区顺式作用元件位置信息

Fig.4 Location information of cis-acting regulatory elements identified in the promoter region of BBM gene family in P. edulis



Fig.5 Chromosomal location of BBM genes from P. edulis

植株再生率^[35]。类型1的愈伤组织质地较坚实,为 非胚性愈伤组织,结构疏松,细胞表面不平整。类 型2的愈伤组织为胚性愈伤组织,容易分化出根和 芽。通过定量RT-PCR分析BBM基因在毛竹不同组 织中的表达特异性(图7)。结果表明PeBBM1在茎和 愈伤组织再生出的植株中表达水平较高,在类型1



A: 叶; B: 类型1的愈伤组织; C: 类型2的愈伤组织; D: 茎; E: 根; F: 芽; G: 愈伤组织再生植株; H: 愈伤组织分化出芽点; I: 愈伤组织分化出的根。 A: heart leaf; B: callus of type 1; C: callus of type 2; D: stem; E: root; F: bud; G: callus regenerating plants; H: shoots regenerated from callus; I: roots regenerated from callus.



图6 实时荧光定量RT-PCR材料的选择 Fig.6 Samples of real-time fluorescent quantitative RT-PCR

A:叶;B:类型1的愈伤组织;C:类型2的愈伤组织;D:茎;E:根;F:芽;G:愈伤组织再生植株;H:愈伤组织分化出的芽点;I:愈伤组织分化出的根。不同小写字母表示不同组织间具有显著性差异,P<0.05;相同小写字母表示不同组织间不具有显著性差异,P>0.05。

A: heart leaf; B: callus of type 1; C: callus of type 2; D: stem; E: root; F: bud; G: callus regenerating plants; H: shoots regenerated from callus; I: roots regenerated from callus. Different lowercase letters indicate significant differences between organisations, P < 0.05; same lowercase letters indicate no significant differences between organisations, P > 0.05.

图7 毛竹BBM基因在不同部位的基因表达模式 Fig.7 Gene expression patterns of BBM genes in different tissues of P. edulis 的愈伤组织中表达水平低; PeBBM2在和愈伤组织 再生出的植株中表达水平较高, 其次是类型2的愈 伤组织。PeBBM3在愈伤组织2和愈伤组织分化的 根中表达水平较低, 在愈伤组织再生植株和愈伤组 织分化出的芽点中表达量较高。PeBBM4在不同部 位表达水平较一致, 在愈伤组织再生植株中表达 平较高。PeBBM5在根和愈伤组织再生植株中表达 水平较高, 在其他组织中表达量较低。PeBBM6在 不同部位表达水平较一致, 在愈伤组织分化出芽点 中表达水平较高。

3 结论与讨论

植物AP2/ERF转录因子是含有多种转录因子的 重要的基因家族之一。BBM转录因子属于AP2家族, 在光皮桦^[5]、陆地棉^[6]、毛白杨^[7]、小麦和玉米^[8]等 植物中都被鉴定出与再生相关。毛竹具有不可替代 的生态、经济价值,但在无性繁殖方面缺乏完善的 组织培养及遗传转化体系,MYB、NAC、WOX等 再生相关转录因子可以促进遗传转化方面的改善, 近些年毛竹基因组序列草图的发表促进了对毛竹转 录因子的研究,研究表明BBM能够响应下游相关基 因从而启动体细胞胚胎的发生,通过鉴定与分析毛 竹BBM转录因子表达模式,可初步了解毛竹BBM基 因的生物学功能及其表达模式^[36]。

本研究从毛竹基因组中鉴定出6个BBM家族基 因,将其分别命名为BBM1~6。通过系统进化树分析 毛竹 BBM均优先与水稻 BBM基因聚类,目前水稻中 有3个BBM基因的生物学功能被报道,在卵细胞中异 位表达BBM1,可以使水稻在不经过减数分裂情况下 卵细胞直接发育成胚进而完成无融合生殖过程。一 般而言,同一基因家族亲缘近的基因,基因结构也相 似,因此可利用其同源性和进化关系,推测毛竹BBM 基因的功能。保守基序分析显示,所有的BBM均 含有5个保守基序,分别是motif1、motif2、motif3、 motif5、motif10,属于高度保守结构。其蛋白二、三 级结构预测得出无规则卷曲和α-螺旋为其结构组成 的主要元件,表明在基因变异和进化时具有保守性, 这与其他物种中BBM的结构特征类似[33]。本研究预 测了毛竹BBM基因在细胞中的位置,发现PeBBM2 和PeBBM3蛋白位于细胞核和细胞质中, PeBBM1、 PeBBM4、PeBBM5和PeBBM6蛋白位于细胞核中。 根据系统发育分析将拟南芥、水稻、玉米、犬蔷

薇、鳞状苜蓿、甘蓝型油菜、大豆和毛竹的BBM 分为3个分支,PeBBM3、PeBBM4和PeBBM5与水 稻中的OsBBM2和OsBBM4聚类在一起,PeBBM1、 PeBBM2和PeBBM6被分在另一分支中,相比于拟 南芥,毛竹BBM基因均优先与水稻BBM基因聚类, 表明竹子BBM基因与水稻BBM基因亲缘关系近。 通过顺式作用元件分析,毛竹BBM转录表达可能会 受到非生物胁迫、光反应和转录调控相关因素的 影响。研究表明MYB转录因子控制细胞的形态和 模式建成,侧面加深了对PeBBM基因的认知^[33]。

在植物组织培养过程中,愈伤组织表现为多种 不同的状态,通过观察愈伤的颜色、质地、形状大 小可将其进行分类,适宜状态的愈伤组织有利于愈 伤组织增殖及提高植株再生率。对6个BBM基因设 计特异性的RT-PCR定量引物进行相对表达量分析, BBM基因在毛竹不同组织中具有表达模式特异性, 大部分的BBM基因在根中表达量较高,不同组织中 表达丰度不一样[33],预示它们功能不完全一样,需 要进一步分析。类型1的愈伤组织质地较坚实为非 胚性愈伤组织,结构疏松,细胞表面不平整。类型2 的愈伤组织为胚性愈伤组织,在愈伤组织增殖培养 基中愈伤能够保持增殖活力,产生新的愈伤块,且 生长过程中较容易产生分化现象,在芽诱导分化培 养基中较易分化出根和芽(课题组数据)。PeBBM1、 PeBBM2、PeBBM3、PeBBM4和PeBBM5在愈伤组 织再生植株中相对表达量最高,与启动子顺式元件 分析相符。推测这些PeBBMs可能参与毛竹愈伤组 织再生出植株的调节过程,之后需要进一步的深入 研究进行验证。

参考文献 (References)

- WU H, LÜ H, LI L, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factors family and the expression patterns of DREB genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126657.
- [2] 吴惠俐. 毛竹AP2/ERF基因家族分析及DREB类转录因子表达 研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [3] 李玉珠, 苗佳敏, 余江弟, 等. BBM转录因子及其在草地早熟 禾无融合生殖中的应用前景[J]. 农业生物技术学报(LI Y Z, MIAO J M, YU J D, et al. BBM transcription factors and their application in fusionless reproduction in grassland early morning glory [J]. Journal of Agricultural Biotechnology), 2021, 29(9): 1808-16.
- [3] NELSON-VASILCHIK K, HAGUE J P, TILELLI M, et al. Rapid transformation and plant regeneration of *sorghum (Sorghum bicolor L.)* mediated by altruistic baby boom and Wuschel2 [J].

- [4] 王诗忆. 光皮桦BBM基因鉴定、克隆与功能研究[D]. 杭州: 浙 江农林大学, 2021.
- [5] 束立哲,宫则宇,雷忠萍,等.陆地棉BABY BOOM基因的克隆 及特征分析[J].农业生物技术学报(SHU L Z, GONG Z Y, LEI Z P, et al. Cloning and characterization of BABY BOOM gene in Upland cotton [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology), 2021, 29 (5): 885-99.
- [6] 杨紫彤,姜廷波,魏建华,等. 毛白杨BABY BOOM基因的克 隆及生物信息学分析[J]. 植物生理学报(YANG Z T, JIANG T B, WEI J H, et al. Cloning and bioinformatics analysis of BABY BOOM gene in *Populus chinensis* [J]. Chinese Journal of Plant Physiology), 2021, 57(11): 2155-66.
- [7] LI M Y, XU Z S, HUANG Y, et al. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in carrot (*Daucus carota* L.) reveals evolution and expression profiles under abiotic stress [J]. Mol Genet Genomics, 2015, 290(6): 2049-61.
- [8] RASHID M, GUANGYUAN H, GUANGXIAO Y, et al. AP2/ ERF transcription factor in rice: genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots [J]. Evol Bioinform Online, 2012, doi: 10.4137/EBO.S9369.
- [9] YANG H F, KOU Y P, GAO B, et al. Identification and functional analysis of BABY BOOM genes from *Rosa canina* [J]. Biol Plant, 2014, 58: 427-35.
- [10] MOOKKAN M, NELSON-VASILCHIK K, HAGUE J, et al. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2 [J]. Plant Cell Rep, 2017, doi: 10.1007/s00299-017-2169-1.
- [11] 王丽丽, 唐一, 黄艳, 等. 梁山慈竹BABY BOOM基因的克隆 与表达分析[J]. 竹子学报(WANG L L, TANG Y, HUANG Y, et al. Cloning and expression analysis of BABY BOOM gene in bamboos *Neophylla* [J]. Acta Bambooica Sinica), 2019,38(2): 24-31.
- [12] KHANDAY I, CHRISTIAN S M, SUNDARESAN V. Rice embryogenic trigger BABY BOOM1 promotes somatic embryogenesis by upregulation of auxin biosynthesis genes [J]. New Phytol, 2020, doi:10.1101/2020.08.24.265025.
- [13] 洪林,杨蕾,杨海健,等. AP2/ERF转录因子调控植物非生物胁 迫响应研究进展[J]. 植物学报(HONG L, YANG L, YANG H J, et al. Progress in the regulation of plant abiotic stress response by AP2/ERF transcription factors [J]. Journal of Botany), 2020, 55(4): 481-96.
- [14] BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA V K, et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth [J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1737-49.
- [15] RANADE S S, EGERTSDOTTER U. *In silico* characterization of putative gene homologues involved in somatic embryogenesis suggests that some conifer species may lack LEC2, one of the key regulators of initiation of the process [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 392.
- [16] JONES T, LOWE K, HOERSTER G, et al. Maize transformation using the morphogenic genes baby boom and wuschel2 [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1864: 81-93.
- [17] LEE H, ZHANG Z J. Agrobacterium-mediated transformation of maize (*Zea mays*) immature embryos [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1099: 273-80.

- [18] PENG Z, LU Y, LI L, et al. The draft genome of the fastgrowing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. Nat Genet, 2013, 45(4): 456-61,e4612.
- [19] PUNTA M, COGGILL P C, EBERHARDT R Y, et al. The Pfam protein families database [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 290-301.
- [20] EL O S, SCHNELL J, ABDEEN A, et al. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors [J]. Plant Mol Biol, 2010, 74(4/5): 313-26.
- [21] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 225-9.
- [22] SHARONI A M, NURUZZAMAN M, SATOH K, et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/ EREBP transcription factor family in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(2): 344-60.
- [23] CHU Z X, MA Q, LIN Y X, et al. Genome-wide identification, classification, and analysis of two-component signal system genes in maize [J]. Genet Mol Res, 2011;10(4): 3316-30.
- [24] BAILEY T L, NADYA W, CHRIS M, et al. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. Nucleic Acids Res, 2006: 369-73.
- [25] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13(8): 1194-202.
- [26] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-4.
- [27] ZHANG H, GAO S, LERCHER M J, et al. EvolView, an online tool for visualizing, annotating and managing phylogenetic trees [J]. Nucleic Acids Res, 2012, doi: 10.1093/nar/gks576.
- [28] 王绍良, 张雯宇, 高志民, 等. 毛竹磷转运蛋白 I 家族基因鉴 定及表达模式[J]. 浙江农林大学学报(WANG S L, ZHANG W Y, GAO Z M, et al. Identification and expression pattern of phosphorus transporter protein family genes in moso bamboo [J]. Journal of Zhejiang Agriculture and Forestry University), 2022, 39(3): 486-94.
- [29] JHA P, KUMAR V. BABY BOOM (BBM): a candidate transcription factor gene in plant biotechnology [J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(11/12): 1467-75.
- [30] 刘俊, 黄容, 程占超, 等. 毛竹PheDof4-1基因克隆及表达分析 [J]. 安徽农业大学学报(LIU J, HUANG R, CHENG Z C, et al. Cloning and expression analysis of PheDof4-1 gene of bamboo [J]. Journal of Anhui Agricultural University), 2017, 44(3): 398-403.
- [31] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量PCR技术研究进展及 其应用[J]. 东北农业大学学报(CHEN X, QI F K, KANG L G, et al. Research progress and application of real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Journal of Northeast Agricultural University), 2010, 8: 148-55.
- [32] 陈东亮, 彭镇华, 高志民. 毛竹PeAP2基因及其启动子的克隆与表达初步分析[J]. 林业科学研究(CHEN D L, PENG Z H, GAO Z M. Cloning and expression of PeAP2 gene and its promoter in *Phyllostachys pubescens* [J]. Forestry Research), 2013, 26(2): 200-6.
- [33] 黄碧芸,卓仁英,乔桂荣.毛竹不同类型愈伤组织比较分析[J/ OL].南京林业大学学报(HUANG B Y, ZHUO R Y, QIAO G R.

Comparative analysis of callus of different types of bamboo [J/ OL]. Journal of Nanjing Forestry University), 2023, 47(6): 141-9.

- [34] MOOKKAN M, KIMBERLY NELSON VASILCHIK, HAGUE J, et al. Morphogenic regulator-mediated transformation of maize inbred B73 [J]. Curr Protoc Plant Biol, 2018, 3(4): e20075.
- [35] BUI L T, PANDZIC D, YOUNGSTROM C E, et al. A fern AINTEGUMENTA gene mirrors BABY BOOM in promoting apogamy in *Ceratopteris richardii* [J]. Plant J, 2017, 90(1): 122-32.
- [36] HORSTMAN A, LI M, HEIDMANN I, et al. The BABY BOOM

transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis [J]. Plant Physiol, 2017, 175(2): 848-5.

- [37] 李昂. 人参BBM基因全长cDNA克隆与序列分析[D]. 延吉: 延 边大学, 2019.
- [38] PAIS M S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment [J/OL]. Front Plant Sci, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00240.
- [39] LEE M M, SCHIEFELBEIN J. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning [J]. Cell, 1999, 99(5): 473-83.