



干旱胁迫下棉花幼苗转录因子 *BES1/BZR1* 对外源油菜素内酯的响应表达特征

安汶铠,常丹,张富春*

(新疆大学 生命科学与技术学院·新疆生物资源基因工程重点实验室,乌鲁木齐 830046)

摘要:植物激素油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)具有提高植物抗旱性的作用,该研究探讨干旱胁迫下外源喷施BR对棉花干旱胁迫响应基因表达的影响。采用PCR方法从棉花‘新陆早17号’幼苗克隆获得1个干旱胁迫响应转录因子基因,命名为*GhBES1/BZR1*(GenBank登录号KP272000)。序列分析表明*GhBES1/BZR1*基因开放阅读框为960 bp,编码319个氨基酸,理论分子量为34.3 kD,理论等电点为8.95。保守结构域分析显示,该基因编码的蛋白具有一个DUF822保守结构域。利用2.5%PEG-6000对棉花‘新陆早17号’幼苗进行干旱胁迫处理24 h,再分别喷施水、BR和Z(BR抑制剂),qRT-PCR分析结果表明,PEG-6000干旱胁迫下用BR处理3 h后,*GhBES1/BZR1*基因表达量明显提高,当BR处理6和12 h时,*GhBES1/BZR1*基因的表达量较3 h时明显下降。研究认为,在干旱胁迫下对棉花喷洒BR,*GhBES1/BZR1*基因能够快速表达以响应干旱胁迫,外源喷施BR有助于提高棉花的抗旱能力。

关键词:棉花;*GhBES1/BRI1*;干旱胁迫;油菜素内酯(BR);表达分析

中图分类号:Q786;Q789 文献标志码:A

Expression Characteristics of Transcription Factor *BES1/BRI1* of Cotton Seedling in Response to Brassinosteroid under Drought Stress

AN Wenkai, CHANG Dan, ZHANG Fuchun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Plant hormone brassinosteroid (BR) can improve the drought resistance of plant. This study explores the effects of spraying BR on the expression of transcription factor *BES1/BRI1* in cotton seedling under drought stress. It is helpful for elucidating the mechanism of BR improving the drought resistance of cotton. The *BES1/BZR1* gene was cloned by using PCR technique from the seedling of cotton ‘XLZ17’ (*Gossypium hirsutum*) and named as *GhBES1/BZR1* (GenBank accession number KP272000). Sequence analysis indicated that *GhBES1/BZR1* contains an open reading frame (ORF) of 960 bp, which encodes 319 amino acids included a conserved domain DUF822. The calculated molecular weight is 34.3 kD and the theoretical isoelectric point is 8.95. After 2.5% PEG-6000 treatment for 24 h, water, BR (brassinosteroids) and Z (BR inhibitor) were sprayed on the seedlings of cotton ‘XLZ17’, respectively. The effects of spraying BR on the expression of *GhBES1/BZR1* were analyzed by the real time quantitative PCR(qRT-PCR). The results showed that the expression levels of *GhBES1/BZR1* were greatly increased after BR spraying within 3 h, and then the expression levels of *GhBES1/BZR1* were significantly decreased after 6 and 12 h. The

收稿日期:2015-01-30;修改稿收到日期:2015-04-22

基金项目:国家自然科学基金·新疆联合基金重点项目(U1303282)

作者简介:安汶铠(1990—),男,在读硕士研究生,主要从事生物化学分子生物学研究。E-mail:873788221@qq.com

*通信作者:张富春,博士,教授,主要从事分子生物学与基因工程研究。E-mail:zfcxju@xju.edu.cn

results demonstrated that spraying BR quickly up-regulated the expression of *GhBES1/BZR1* under drought stress, which might be contributed drought resistance of cotton.

Key words: *Gossypium hirsutum*; *GhBES1/BRI1*; drought stress; brassinosteroid(BR); expression analysis

棉花作为新疆的主要经济作物,干旱是制约新疆棉区棉花产量和品质的主要环境因素之一。油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)作为一种影响植物生长发育和抗逆的植物内源激素,在提高植物抗盐、抗旱、耐高温以及调节植物衰老等生理功能方面发挥重要作用^[1-2]。研究表明 BR 能够广泛参与植物各种生理过程,调控植物生长发育以及对逆境条件下的生理响应^[3-6]。经过 BR 喷施处理后,植物叶片含水量增加,叶片水势提高,且植物的蒸腾作用明显降低,这样既保持了细胞膨压,又能够缓解干旱胁迫,改善植物细胞中的水分状况,提高植物在干旱胁迫下的生存能力。近年来,随着 BR 促进植物抗逆性研究的深入,BR 已经被广泛应用于农林业的生产中^[7-12]。

BZR1/BES1 是 BR 信号通路中一种重要的转录因子,与 BR 结合后使得 *BRI1* 的羧端磷酸化,调控 *BKI1*(*BRI1* kinase inhibitor1)从质膜上解离下来,使 *BRI1* 与共受体 *BAK1*(*BRI1*-associated receptor kinase)结合^[13-14],并形成异源二聚体,进而通过相互磷酸化完全激活 BR 信号通路^[15],异二聚体 *BRI1-BAK1* 可使得 *BSK* 激活, *BSK* 又能够活化 *BSU11*(*BRI 1 suppressor 1*), *BSU1* 可使下游的 *BIN2* (Brassinosteroid-insensitive 2) 失活^[16],而 *BIN2* 则影响 *BZR1/BES1* 的磷酸化^[17]。Kim 等发现磷酸化后的 *BZR1/BES1* 失去了核输出以及与 DNA 结合的能力,并且可被蛋白酶降解,被激活的 *BSU1* 可以使 *BIN2* 的 Tyr 磷酸化位点去磷酸化从而抑制其活性,使得 *BZR1/BES1* 被蛋白磷酸 2A (PP2A)去磷酸化,最终在细胞核内大量积累^[18]。核内聚集的 *BZR1/BES1* 能够与下游基因启动子上特定区域结合,激活转录,从而调节 BR 靶基因的表达,最终调节植物的生长、发育和抗逆性能^[19]。因此研究 BR 信号通路中基因 *BZR1/BES1* 的表达调控机理显得尤为重要。

本研究以新疆的主栽棉花品种‘新陆早 17 号’的幼苗为材料,根据亚洲棉‘石系亚 1 号’的转录组测序中转录因子 *BES1/BZR1* 基因的开放阅读框序列^[20],通过 PCR 克隆获 *BES1/BZR1* 转录因子基因,命名为 *GhBES1/BZR1*(GenBank 登录号 KP272000);在生物信息学分析的基础上,进一步探讨干旱胁迫下用油菜素内酯及油菜素内酯抑制剂(Z)处理棉花后,*Gh-*

BES1/BZR1 的表达变化规律,研究外源喷施植物激素 BR 对干旱胁迫下棉花 *GhBES1/BZR1* 表达的影响,揭示 BR 提高棉花抗旱能力的分子机制,为棉花生产中合理使用 BR 提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

棉花‘新陆早 17 号’种子由新疆农业科学院经济作物研究所玛纳斯实验站提供。挑选籽粒饱满大小一致的棉花种子,用 70% 乙醇消毒 1 min, 蒸馏水冲洗 3~4 次,用 15% 过氧化氢浸种 5 h,再用蒸馏水冲洗 3~4 次,播种到固体 MS 培养基中,进行无菌培养,10 d 后将棉花幼苗转至 Hoagland 营养液^[21]中继续进行液体培养,每隔 5~7 d 换 1 次营养液,以 5~6 片真叶期的棉花幼苗为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 实验材料的处理 待棉花幼苗生长至 5~6 片真叶期时,用 2.5% PEG-6000 干旱胁迫处理 24 h 后,分别用水、BR(0.5 mg/L) 和 Z(1.0 mg/L, BR 抑制剂)喷施。具体处理组为:(1)Hoagland 营养液+蒸馏水为对照组(CK);(2)含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液+蒸馏水(PEG);(3)Hoagland 营养液+0.5 mg/L BR(BR);(4)含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液+0.5 mg/L BR(PEG+BR);(5)含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液+0.5 mg/L BR+1.0 mg/L Z (PEG+BR+Z);(6)含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液+1.0 mg/L Z (PEG+Z)。每隔 3 h 进行 1 次喷洒处理,在 0、3、6、12、24 h 时采集不同处理的不同棉花幼苗底部倒数第 3~4 片的 10 个叶片,分别称取 0.1 g 棉花幼苗叶片,迅速冻于液氮中备用。

1.2.2 棉花幼苗总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 0.1 g 棉花幼苗叶片在液氮中充分研磨,采用植物总 RNA 提取试剂盒(北京百泰克公司)提取棉花总 RNA,接着进行定量和电泳检测。采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(大连 TaKa-Ra 公司)试剂盒合成 cDNA。

1.2.3 *GhBES1/BZR1* 基因的扩增和鉴定 根据亚洲棉‘石系亚 1 号’转录因子 *BES1/BZR1* 的开放阅读框序列,设计扩增开放阅读框的上游引物(5'-

GCGCTGCTTGAGGAAGGTATTG-3') 和下游引物(5'-CTGACAGTGGCTTGATGTGAT-GCTC-3'),以棉花幼苗叶片的cDNA为模板,使用ExTaq酶PCR扩增目的基因,扩增条件为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s;72℃延伸90 s,30个循环;72℃延伸10 min,反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的基因片段,与pMD18-T载体连接,并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑选菌液进行PCR及质粒酶切鉴定的阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.4 GhBES1/BZR1蛋白生物信息学分析 利用ExPASy ProtParam(http://expasy.org/tools/pi_tool.html)分析GhBES1/BZR1蛋白的理化性质及疏水性;用NCBI CDD数据库分析蛋白质的保守结构域,用SignalP4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)软件预测蛋白质的信号肽;Cell-PLoc 2.0 PSORT(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)预测蛋白质的亚细胞定位;GOR4(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl)软件预测蛋白质二级结构;NetPhos(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>)分析蛋白质的磷酸化位点;NPS Prosite Scan(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl)分析蛋白活性位点;用MEGA 5.0软件构建系统进化树^[22-23]。

1.2.5 不同处理 GhBES1/BZR1 基因的表达 根据GhBES1/BZR1的cDNA序列设计上游引物(5'-TGGGATGAAATGAATGCTGGGC-3')和下游引物(5'-AGTGTAAAGTTCGAGATCATCAGCTGC-3'),以18S基因作为内参基因,设计上游引物(5'-CAACTTGCCTCAAAGACTCGATGGTT-3')和下游引物(5'-CAAGGAATCGAAACGAAAGAA-GG-3')。以处理组棉花幼苗叶片的cDNA为模板,取1.0 μ L cDNA,qRT-PCR参照带有ROX的Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(美国Invitrogen公司)试剂盒说明书进行。RT-PCR反应参数为:94℃预变性15 s;94℃变性30 s;59℃退火30 s;72℃延伸45 s;40个循环。采用ABI PRISM 7500实时定量PCR仪进行检测,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析^[24]。

2 结果与分析

2.1 GhBES1/BZR1基因的克隆和鉴定

以棉花‘新陆早17号’幼苗叶片的cDNA为模板,根据BES1/BZR1基因开放阅读框序列设计

的特异性引物,通过PCR进行GhBES1/BZR1开放阅读框的扩增。结果表明PCR扩增出与预测长度一致的条带(图1),测序结果表明开放阅读框为960 bp,编码319个氨基酸,提交NCBI基因库(GenBank登录号KP272000),所获得的GhBES1/BZR1基因为正确的目的基因。

2.2 GhBES1/BZR1蛋白的理化特性和结构分析

通过在线EXPASY的ProtParam软件对BES1/BZR1基因编码蛋白的理化性质进行分析表明,GhBES1/BZR1蛋白的理论分子量为34.3 kD,理论等电点为8.95。利用在线NCBI的保守结构域数据库(conserved domain database,CDD)对GhBES1/BZR1蛋白的保守结构域进行预测,结果说明GhBES1/BZR1蛋白含有一个DUF822保守结构域,而DUF822为基因未知功能的植物蛋白,此家族由未知功能的几个植物蛋白的N末端区域组成。利用SignalP4.0 Server软件对GhBES1/BZR1蛋白进行信号肽的预测。结果说明GhBES1/BZR1蛋白的N端不存在剪切位点,表明其不包含信号肽,推测GhBES1/BZR1蛋白为非分泌蛋白。利用在线EXPASY的ProtParam软件对GhBES1/BZR1蛋白的疏水性/亲水性进行预测。推测GhBES1/BZR1蛋白是一种可溶性蛋白。利用在线软件GOR4对GhBES1/BZR1蛋白的二级结构进行预测。结果表明,GhBES1/BZR1蛋白主要由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链构成(表1)。其中无规则卷曲结构最多,占据整条链的62.07%。 α -螺旋占了24.76%,其余的全为延伸链。

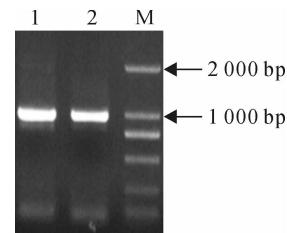


图1 GhBES1/BZR1基因的PCR扩增
Fig.1 PCR amplification of GhBES1/BZR1 gene
M. DL2000; 1, 2. GhBES1/BZR1

表1 GhBES1/BZR1蛋白的二级结构预测

Table 1 GhBES1/BZR1 protein of secondary structure prediction

二级结构类型 Secondary structure	氨基酸残基数目 Amino acid residue	百分比 Percentage/%
α -螺旋 Alpha helix	79	24.76
无规则卷曲 Random coil	198	62.07
延伸链 Extended strand	42	13.17

2.3 GhBES1/BZR1 蛋白质磷酸化位点及活性位点的分析

磷酸化是生物体内的一种重要调节方式,主要在细胞信号转导和蛋白调控过程中发挥作用^[25]。利用 NPS(network protein sequence analysis)的Prosite Scan对GhBES1/BZR1蛋白进行活性位点分析。如表2所示,GhBES1/BZR1有3类磷酸化位点和1类N-糖基化位点、1类酰胺化位点和1类豆蔻酰化位点。

2.4 GhBES1/BZR1 蛋白的系统进化树

通过NCBI数据库检索GhBES1/BZR1同源蛋白序列,使用MEGA 5.0软件构建系统进化树。其结果表明GhBES1/BZR1蛋白和可可聚类在一起(图2),Blast比对编码棉花和可可这两种植物同源蛋白的序列相似度达到99%。

2.5 干旱胁迫下不同处理 GhBES1/BZR1 基因的表达分析

采用qRT-PCR方法,以18S作为内参基因,分别检测不同处理和不同时间棉花幼苗叶片Gh-

BES1/BZR1的表达变化(图3)。

实验结果表明,处理3 h时,PEG-6000处理相对于水处理的GhBES1/BZR1基因表达量极显著地上调了3.9倍($P<0.01$),PEG-6000处理下喷洒BR(PEG+BR)相对于其他处理基因的表达量最高,而PEG+BR处理下再喷洒BR抑制剂(PEG+BR+Z)相对于PEG+BR处理有显著性的降低($P<0.05$)。说明PEG处理下喷施BR能够显著提高GhBES1/BZR1的表达,而喷施BR抑制剂后GhBES1/BZR1的表达显著降低。处理6 h时,PEG+BR处理的基因表达量相对于其他处理是最高的,除PEG处理和PEG+BR处理外,其它处理下该基因的表达量都有所上升,PEG+BR处理的基因表达量有所下降,但相互之间都无显著性差异($P>0.05$)。说明在6 h直接喷施BR和在PEG-6000处理下喷施BR均能够显著提高GhBES1/BZR1,而喷施BR抑制剂后GhBES1/BZR1的表达也显著降低。处理12 h时,各处理的GhBES1/BZR1表达量相对于6 h处理都有所下降,而PEG+BR处理的

表2 GhBES1/BZR1在NPS中活性位点预测分析

Table 2 The prediction analysis of GhBES1/BZR1 active site in NPS

活性位点名称 Active site	序号 Prosite access No.	膜体类型 Motif model	氨基酸序列 Amino acid sequence	概率值 Randomized probability
N-糖基化位点 N-glycosylation site	PS00001	N-{P}-[ST]-{P}	131-134 NLSS 287-290 NMTG	5.138e-03
cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 cAMP-and GMP-dependent protein kinase phosphorylation site	PS00004	[RK](2)-x-[ST]	188-191 KRFS	1.572e-03
蛋白激酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS00005	[ST]-x-[RK]	9-11 TWK,69-71 TYR 140-142 SSK,166-168 TSR 169-171 TPR,186-188 TGK	1.423e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	[ST]-x(2)-[DE]	9-12 TWKE,62-65 TVEE 172-175 TRSD,174-177 SDWD 213-216 SRLE,84-89 GGSASA	1.482e-02
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	G-{EDRKHPFYW}-x (2)-[STAGCN]-{P}	85-90 GSASAS,118-123GNADAN 135-140 GSSSAS,151-156 GGSISA 253-258 GQSGTC,265-270 GVDQTS 285-290 GSNTMG,314-319 GNSKTR	1.397e-02
酰胺化位点 Amidation site	PS00009	x-G-[RK]-[RK]	186-189 TGKR	8.636e-04

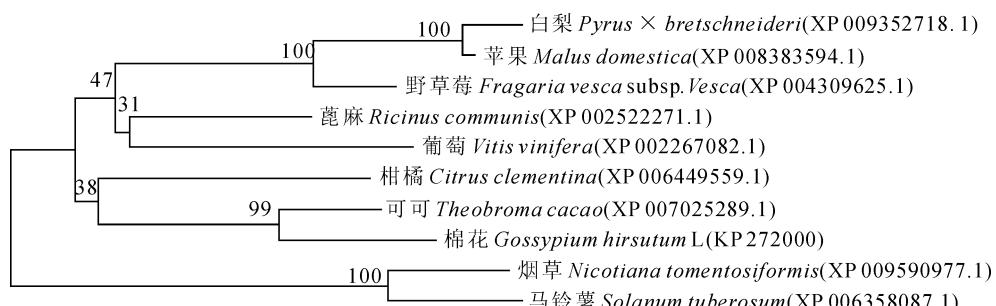


图2 不同植物基于GhBES1/BZR1氨基酸序列的系统进化树

分支点的数字表示从1 000次重复计算得到的Bootstrap百分比值

Fig. 2 Phylogenetic tree of different plants based on amino acid sequence of GhBES1/BZR1

Numbers represent the Bootstrap percent values calculated from 1 000 replicates

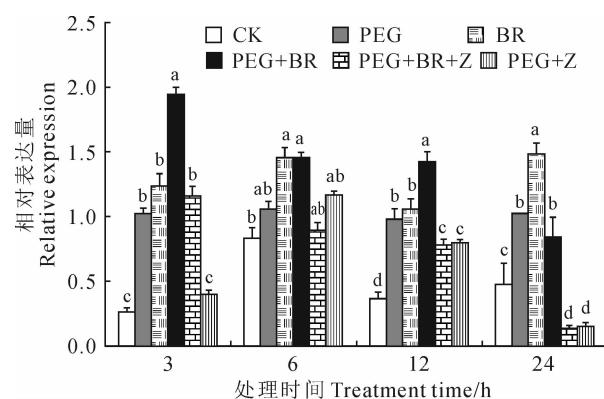


图3 干旱胁迫下不同处理‘新陆早17号’棉花幼苗叶片中GhBES1/BZR1的相对表达
不同小写字母表示同一时间不同处理下差异显著($P<0.05$)

Fig. 3 Relative expression of *GhBES1/BZR1* in the seedling leaves of cotton ‘XLZ17’ for the different treatments under drought stress
Different letters represent significant differences among treatments under the same time ($P<0.05$)

基因表达量依然最高,并显著性地高于PEG-6000处理和PEG+BR+Z处理($P<0.05$),分别是其1.3和1.6倍。处理24 h时,PEG+BR处理的基因表达量降低,直接喷施BR处理的基因表达量达到最高。而PEG+Z和PEG+BR+Z处理的基因表达量只有BR处理组的1/7左右。说明随着PEG处理时间的延长,在PEG处理下喷施BR *GhBES1/BZR1*的表达明显下降,而喷施BR抑制剂后*GhBES1/BZR1*的表达更加显著降低,已经低于对照组,说明随着处理时间的延长,BR抑制剂极大地降低了*GhBES1/BZR1*的表达。

3 讨论

BR作为一种重要的植物内源激素,在植物的生长发育和抵御干旱方面发挥作用。*BES1/BZR1*作为BR信号通路中的一种重要的转录因子,其编码的*BES1/BZR1*蛋白是植物防御的一种内源信号分子,当植物受到各种胁迫时,可以诱导防御基因的表达去抵御外界的胁迫,并直接影响植物的生长发育同时调节植物的生理代谢过程^[26-27]。

通过对棉花‘新陆早17号’*GhBES1/BZR1*基因序列的生物信息学分析表明,该基因编码蛋白质的氨基酸序列与可可编码的*BES1/BZR1*氨基酸序列的相似性达99%,且与可可的*BES1/BZR1*聚在进化树的同一分支上,这表明其进化上与可可具有趋同性。利用NPS的Prosite Scan对*BES1/BZR1*蛋白进行活性位点分析结果表明,*GhBES1/BZR1*有3类磷酸化,这可能是与*GhBES1/BZR1*蛋白的

磷酸化参与调解干旱胁迫的信号通路有关。蛋白质的疏水性通常依据蛋白的GRAVY值预测,而GRAVY值通常分布在-2~2之间,正值表明蛋白为疏水蛋白,负值表明为亲水蛋白。预测显示*GhBES1/BZR1*蛋白的GRAVY值为-4.211,说明*GhBES1/BZR1*蛋白是一种可溶性蛋白,结果与*BES1/BZR1*蛋白不与膜结合在细胞核内与特定启动子发挥作用的结果相一致^[13]。表明该蛋白可能是一种能够通过磷酸化和去磷酸化在BR信号通路中发挥作用的可溶性蛋白。

BR在作物上的应用主要是浸种或外源喷等,有关BR信号转导途径中的重要组分如*GhBES1/BZR1*基因表达变化对作物抗旱性的影响鲜见报道。根据河南棉花所对亚洲棉进行干旱胁迫下的转录组分析发现,BR信号通路中*BES*、*BKI*、*BRI*等基因的表达上调,其中PEG模拟干旱胁迫3 h后,亚洲棉‘石系亚1号’叶中*GhBES1/BZR1*表达量上调了2.7倍^[20]。本研究结果中,PEG-6000模拟干旱胁迫,PEG+BR处理3 h时*GhBES1/BZR1*基因的表达量分别是PEG和PEG+BR+Z处理的1.9倍和1.7倍。BR处理6和12 h时,*GhBES1/BZR1*表达量相对于3 h时都有明显下降,但喷施BR表达量明显高于没有喷施BR处理组,而BR+Z处理*GhBES1/BZR1*表达量降低,这说明喷施BR能够诱导*GhBES1/BZR1*表达上调,而BR抑制剂Z能够干涉BR的作用致使*GhBES1/BZR1*表达下降。喷施BR处理下3 h时,*GhBES1/BZR1*表达量快速升高,表明在干旱胁迫下喷施BR能够让*GhBES1/BZR1*表达快速升高以响应干旱胁迫。而喷施BR 6、12和24 h相对于3 h处理*GhBES1/BZR1*表达有所下降,则表明在干旱胁迫下喷施BR对于*GhBES1/BZR1*表达的影响在时间上没有持久性,伴随着时间的延长诱导作用逐渐减弱,与植物激素作用快的特性相一致。在没有干旱胁迫而单独喷施BR处理24 h时,*GhBES1/BZR1*表达量远高于干旱胁迫下喷施BR处理。说明干旱胁迫下喷施BR可快速诱导*GhBES1/BZR1*表达,但在没有干旱胁迫下喷施BR诱导*GhBES1/BZR1*表达明显存在一定的滞后性,证明干旱胁迫下喷施BR是*GhBES1/BZR1*快速表达诱导因素。

总之,从棉花‘新陆早17号’幼苗中克隆获得的转录因子*GhBES1/BZR1*,在BR信号通路的基因调控中发挥重要作用,在干旱胁迫下外源喷施BR及BR抑制剂Z对棉花*GhBES1/BZR1*基因表达有明显的影响。表明BR是促进干旱胁迫下*GhBES1/BZR1*表达的主要诱因,干旱胁迫和非干旱

胁迫喷施 BR 能够直接影响 *GhBES1/BZR1* 表达水平升高的速率。进一步探讨外源喷施 BR 对棉花

GhBES1/BZR1 表达的影响,有助于阐明 BR 调控棉花抗旱性的分子机理。

参考文献:

- [1] GUO H Q(郭慧琴),REN W B(任卫波),LI P(李平),et al. Effect of epi-brassinosteroid and gibberellin on seed germination and seedling growth of *Leymus chinensis*[J]. *Pratacultural Science*(草业科学),2014,31(6):1 097—1 103(in Chinese).
- [2] BAJGUZ A,HAYAT S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2009,47(1):1—8.
- [3] WANG H H(王红红),LI K R(李凯荣),HOU H W(侯华伟),et al. Research progress of plant stress-resistance promoting related to brassinolides[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*(干旱地区农业研究),2005,23(3):213—219(in Chinese).
- [4] LI K R(李凯荣),FAN J SH(樊金栓). Research progress brassinosteroid lactones—the new plant hormone in forestry[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*(干旱地区农业研究),1998,16(4):104—109(in Chinese).
- [5] SAIRAM R K. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties[J]. *Plant Growth Regulation*,1994,14(2):173—181.
- [6] LI K R,WANG H H,HAN G,et al. Effects of brassinolide on the survival,growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water stress[J]. *New Forests*,2007,35(3):255—266.
- [7] ZHANG M C,ZHAI Z X,TIAN X L,et al. Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean(*Glycine max* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*,2008,56(3):257—264.
- [8] FAROOQ M,WAHID A,BASRA S M A,et al. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*,2009,195(4):262—269.
- [9] XU F F(徐芬芬),XU W H(徐卫红). Induction of resistance to downy mildew in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* L. by brassinolide[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*(河南农业科学),2013,49(5):658—665(in Chinese).
- [10] WU X X(吴雪霞),ZHA D SH(查丁石),et al. Effects of exogenous 24-epibrassinolide on plant growth and antioxidant system in eggplant seedlings under high temperature stress[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学报),2013,49(9):929—934(in Chinese).
- [11] 黄鲤娴.BR 相关基因转化水稻及转基因植株的耐盐性分析[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [12] QIAN W J(钱文静),LIU J(刘静),SONG D(宋丹),et al. Research progress on brassinosteroid related genes and their functions in rice[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*(河南农业科学),2013,42(9):1—5(in Chinese).
- [13] XIONG J L(熊俊兰),KONG H Y(孔海燕),SONG D(宋丹),et al. Effects of brassinosteroids on plant drought adaptability and their regulatory mechanism[J]. *Journal of Lanzhou University*(兰州大学学报),2013,49(5):658—666(in Chinese).
- [14] WANG X L,CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1,a negative regulator of BRI1 signaling,from the plasma membrane [J]. *Science*,2006,313(5 790):1 118—1 122.
- [15] NAM K H,LI J. BRI1/BAK1,a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. *Cell*,2002,110(2):203—212.
- [16] TANG W Q,KIM T W,OSES P J A,et al. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*[J]. *Science*,2008,321(5 888):557—560.
- [17] KIM T W,GUAN S H,SUN Y,et al. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors[J]. *Nature Cell Biology*,2009,11(10):1 254—1 260.
- [18] TANG W Q,YUAN M,WANG R J,et al. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1[J]. *Nature Cell Biology*,2011,13(2):124—131.
- [19] HE J X,GENDRON J M,SUN Y,et al. BZR1 is a t transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses[J]. *Science*,2005,307(5 715):1 634—1 638.
- [20] ZHANG X,YAO D,WANG Q,XU W,WEI Q,et al. mRNA-seq analysis of the *Gossypium arboreum* transcriptome reveals tissue selective signaling in response to water stress during seedling stage[J]. *PLoS ONE*,2013,8(1):e54762.
- [21] MUHEREPIYA A(木合热皮亚·艾尔肯),ZHANG F CH(张富春). Physiological and biochemical analysis for the salt tolerance of transgenic cotton transformed by the vacuolar H⁺-Pyrophosphatase gene(VP1) from *Halostachys caspica*[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*(新疆农业科学),2013,50(6):1 016—1 023.
- [22] MA Y B(马燕斌),WU X(吴霞),WANG X(王霞),et al. Specific expression of *BnDGAT1* gene in *Brassica napus*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2013,33(10):1 958—1 963(in Chinese).
- [23] CUI B(崔波),JIANG S H(蒋素华),LIU J(刘佳),et al. Cloning and expression analysis of AP1-like gene from *Sedirea japonica* [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2013,33(9):1 739—1 744(in Chinese).
- [24] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*,2001,25(4):402—408.
- [25] CHANG D(常丹),ZHANG X(张霞),ZHANG F CH(张富春)et al. Cloning and expression analysis of *HcPEAMT* gene from *Halostachys caspica*[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报),2014,34(8):1 522—1 528(in Chinese).
- [26] KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress responses[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*,2003,22(4):289—297.
- [27] BAJGUZ A. Effect of brassinosteroids on nucleic acid and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2000,38(3):209—215.

(编辑:宋亚珍)