

毛竹 *PheDof4-1* 基因克隆及表达分析

刘俊, 黄容, 程占超, 牟少华, 李雪平*, 高健

(国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: Dof (DNA binding with one finger) 蛋白是植物特有的一类转录因子, 由多基因共同编码, 参与植物转录调控、生长发育及胁迫响应等生物学过程。以毛竹为研究对象, 克隆了 1 个 *Dof* 基因, 命名为 *PheDof4-1*, 基因长度为 1 473 bp, 推测其蛋白质产物的分子量是 53.2 kDa, 等电点为 8.05。qRT-PCR 结果显示, *PheDof4-1* 在低温和 250 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的幼茎中诱导表达, 而在 20% PEG8000 处理的根中表达则受到强烈抑制, 在叶片中不同处理条件下呈现不同的表达趋势。研究结果为 *PheDof4-1* 在非生物胁迫中的作用提供理论依据, 为竹子分子育种提供参考。

关键词: 毛竹; Dof 转录因子; 非生物胁迫; 表达模式

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)03-0398-06

Molecular cloning and expression analysis of the *PheDof4-1* gene in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)

LIU Jun, HUANG Rong, CHENG Zhanchao, MU Shaohua, LI Xueping, GAO Jian

(Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102)

Abstract: Dof (DNA binding with one finger) proteins forming an important transcriptional factor family encoding by multiple genes are involved in gene transcriptional regulation, development and stress-responses in plants. In this study, one of *Dof* genes, *PheDof4-1* (Gene ID No. PH01000209G1040) was isolated from moso bamboo and the sequence was 1 473 nt in length. The predicted molecular weight of *PheDof4-1* protein was 53.2 kDa, and the pI value was 8.05. The qRT-PCR analysis displayed that the *PheDof4-1* transcription level in young stem was induced following exposure to cold stress and salt treatment, however, the expression was restrained in the root under drought treatment. *PheDof4-1* showed different expression patterns in the leaf under different stress treatments.

Key words: moso bamboo; Dof transcription factor; abiotic stress; gene expression

Dof (DNA binding with one finger) 转录因子是植物特有的一类转录因子, 一般由 200~400 个氨基酸残基组成, 因含有一个独特的 Cys 残基的单锌指保守 DNA 结构域, 命名为 Dof 结构域^[1]。自从第一个转录因子 *ZmDof1* 从玉米中被鉴定出来以后, 许多高等植物和单细胞藻类的 *Dofs* 基因相继被报道^[2-7]。如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组中有 37 个 *Dofs* 基因^[1], 水稻 (*Oryza sativa*) 中有 30 个^[8], 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 中有 27 个^[9], 玉米 (*Zea mays*) 中有 18 个^[10], 高粱 (*Sorghum bicolor*) 中有 28 个^[11]。

研究表明, Dof 转录因子在植物生长发育、信号转导、非生物胁迫、光周期调节和胚胎发育等多种表达调控途径中都发挥了重要作用^[12-16]。在拟南芥中, *DAG1* 和 *DAG2* 促进种子萌发^[17], *CDFs* 响应干旱和盐胁迫处理, 并且参与光周期调控开花^[18]; 许多 *Dofs* (*AtDof2.4*, *AtDof5.8* 和 *AtDof5.6/HCA2*) 基因在维管发育早期细胞中表达^[19-20]; 玉米 *Dof1* 和 *Dof2* 促进碳水化合物代谢相关基因表达^[21]; 在水稻中, *OsDof3* 参与赤霉素表达调控^[13]; 长日照条件下, 过表达 *OsDof12* 基因, 促使水稻提前开花, 并且 *Hd3a* 和 *OsMADS14* 基因表达量升高^[22], 在玉米幼

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 国家林业局“948”项目 (2014-4-74) 和国家自然科学基金 (31570673) 共同资助。

作者简介: 刘俊, 硕士。E-mail: liujun_0325@163.com

* 通信作者: 李雪平, 博士, 副研究员。E-mail: lxp@icbr.ac.cn

苗中, *ZmDofs* 基因在盐胁迫处理下诱导表达, 说明 *ZmDofs* 响应盐胁迫处理^[23]。Dof 转录因子参与多种代谢调控途径, 因此, 毛竹中 *Dofs* 基因的识别, 以及其在非生物胁迫方面的功能还需要进一步的探索和挖掘。

毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 是禾本科 (Graminales) 竹亚科 (Bambusoideae) 刚竹属 (*Phyllostachys*) 散生竹种, 是我国分布面积最大 (占全国竹林总面积的 2/3 以上)、范围最广且开发利用程度最高的竹种之一。但是毛竹开花周期长, 而且花期不确定, 一旦开花就会导致大面积死亡, 造成严重的经济损失和生态破坏。因此, 研究毛竹开花的分子调控机理, 不仅具有较高的理论价值, 而且在维持生态平衡、增加社会效益方面也有重要的现实意义。虽然近年来对毛竹的研究也取得了一些进展^[24-29], 但是, 对于 *Dof* 基因的研究主要集中在模式植物中, 毛竹中还未有相关报道。近年来, 本实验室对毛竹花发育时期进行转录组和 RNA-seq 测序分析, 结果显示 *PheDofs* 基因在毛竹花器官中的表达量较高, 受干旱等环境因素的影响, 因此推测毛竹 *PheDofs* 基因与干旱等非生物胁迫密切相关^[30-31]。

本研究从毛竹中分离了 *PheDof4-1* 基因并进行生物信息学分析, 利用 qRT-PCR 技术, 检测了 *PheDof4-1* 基因在模拟干旱处理下根、茎、叶中的表达模式, 以期为深入研究毛竹 Dof 转录因子非生物胁迫提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毛竹种子采集于广西壮族自治区, 位于南岭山系的西南部, 置于恒温光照培养箱中, 昼夜温度是 25/18 °C, 光周期为光/暗 16/8 h, 培养至 3 个月左右。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和农杆菌菌株 GV3101 由本实验室保存。

1.2 试验处理

分别取未处理毛竹实生苗根、茎及叶片组织, 液氮速冻, -80 °C 冰箱冷冻保存。盐胁迫处理, 用 0.25 mol·L⁻¹ NaCl 对实生苗培养基进行浇灌; 干旱胁迫, 利用 20% PEG8000 进行浇灌; 低温处理, 将毛竹实生苗置于 4 °C 培养箱中进行培养, 分别取处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 的根、茎、叶组织, 在液氮中迅速冷冻, -80 °C 冷冻保存。

1.3 cDNA 模板的合成

利用 Trizol Reagent 试剂提取毛竹实生苗根、幼茎及叶片中的总 RNA, 使用无 RNA 酶的 DNase I (TIANDZ) 去除基因组 DNA, 用紫外分光光度计测量 A₂₆₀ 与 A₂₈₀ 的比值及 RNA 浓度, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 检测 28 S、18 S 和 5 S 条带的亮度和完整性, 通过 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链, 合成产物置于 -20 °C 冰箱保存。

表 1 所用引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 (5' -3') Primer sequence
<i>PheDof4-1-F</i>	GGAATTCATGGCAGCGCTTAGGGGC
<i>PheDof4-1-R</i>	GGGTACCTCAAGTCTCTCTGAAATG ACTGAGA GCG
<i>TIP41-F</i>	AAAATCATTGTAGGCCATTGTGC
<i>TIP41-R</i>	ACTAAATTAAGCCAGCGGGAGTG
<i>qPheDof4-1-F</i>	cTGATGATAAGAAAGGCGTATTCAAGT
<i>qPheDof4-1-R</i>	TCAAGTCTCTCTGAAATGA

1.4 基因克隆及生物信息学分析

1.4.1 基因克隆 根据毛竹基因组数据库, 分离 *PheDof4-1* 基因的 CDS 序列, 通过引物设计软件 (Oligo 7) 设计 PCR 特异扩增引物, 扩增引物为 *PheDof4-1-F* 和 *PheDof4-1-R* (见表 1)。通过 RT-PCR 反应扩增目的基因, 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s, 进行 29 个循环, 72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存, 将目的 DNA 片段连接至 pGEM-T easy 载体。

1.4.2 基因生物信息学分析 用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对基因的分子量和等电点进行预测, SMART 工具查询目的基因氨基酸序列的保守结构域及位置, Plant Care (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件对序列顺势作用元件进行分析, 并用 MEGA 6.0 软件的邻接法, 构建基于目的基因编码的蛋白构建系统进化树, 分析其进化关系, 利用 Gene Structure Display Server (<http://gsds1.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 软件对基因组序列进行结构分析。

1.5 干旱、低温和盐处理条件下基因表达

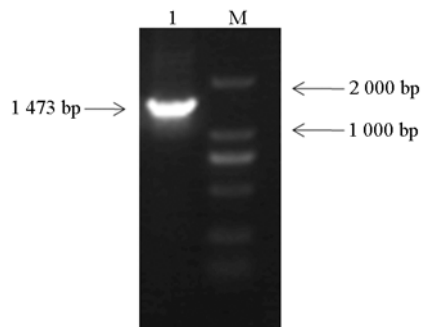
取 3 个月大小长势基本一致的毛竹实生苗 (培养方法同 1.1), 将材料分为 A、B、C 和 D 4 组, 每组设置 3 个生物学重复, A 为对照组, B、C、

D 3 组分别进行干旱、低温和盐处理。在处理后 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 8 个时间点分别取胁迫处理实生苗的根、幼茎和叶片，提取总 RNA，通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)，检测目的基因表达情况。*TIP41* 基因作为内参基因^[32]，引物见表 1，每个反应设置 3 个生物学重复，生物技术和数据均使用 Roche LightCycler® 480 仪器进行分析，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[33]分析 3 次生物学试验的数据，Excel 进行作图。

2 结果与分析

2.1 *PheDof4-1* 基因克隆

以 *PheDof4-1-F* 和 *PheDof4-1-R* 为引物进行 PCR 扩增反应，PCR 反应产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳，在 1 000~2 000 bp 之间有一条清晰的亮带(见图 1)，连接 pGEM-T easy 载体，进行测序(上海生工生物工程公司)，序列长度为 1 473 bp。



M: Marker; 1: PCR 产物

图 1 *PheDof4-1* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis of PCR product for *PheDof4-1* gene
M: DL 2000 marker; lane 1. PCR products

2.2 生物信息学分析

PheDof4-1 基因编码 490 个氨基酸，蛋白质的分子量为 53.20 kDa，等电点为 8.06。氨基酸序列结构分析表明，*PheDof4-1* 蛋白含有典型的完整的 zf-dof 结构，结构域位于 105 K 到 166 S 之间。*PheDof4-1* 基因起始密码子上游约 2.5 kb 序列进行顺势作用元件分析，发现含有 TATA-box，CAAT-box 等典型的真核生物顺势调控元件，还含有其他重要的作用元件，主要参与光响应、非生物胁迫和激素应答等相关调控。其中，光应答元件数量最多为 11 个，如 G-Box、GAG-motif、AE-box、ATCT-motif 和 Box II 等调控元件，该基因还含有非生物胁迫响应的元件，如逆境响应元件 TC-rich repeats，干旱诱导元件 MBS，此外，还存在一些与赤霉素和水杨酸等激素相关元件如：GARE-motif、

TATC-box 和 TCA-element 等多种调控元件。对 *PheDof4-1* 基因组序列进行结构分析，结果显示其含有 2 个外显子和 1 个内含子，如图 2 所示。

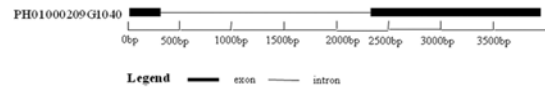


图 2 *PheDof4-1* 基因结构分析

Figure 2 Gene structure analysis of *PheDof4-1*

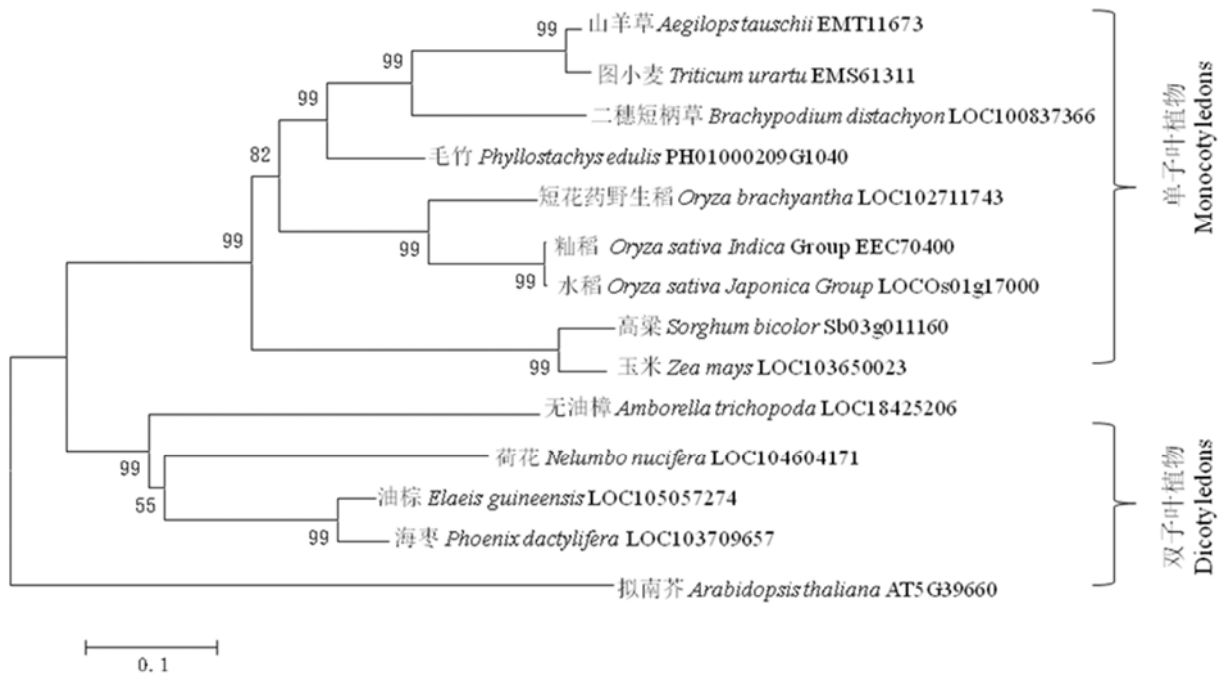
将 *PheDof4-1* 与水稻、小麦、玉米、高粱、大豆和毛果杨等物种中的同源基因进行氨基酸序列比对，结果(图 3)发现 *PheDof4-1* 与单子叶植物二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、水稻 (*Oryza sativa Japonica Group*)、山羊草 (*Aegilops tauschii*)、图小麦 (*Triticum urartu*) 和玉米 (*Zea mays*) 等聚在一起，双子叶植物拟南芥、无油樟 (*Amborella trichopoda*) 和海枣 (*Phoenix dactylifera*) 等聚为一枝，这与植物进化关系相一致，并且，*PheDof4-1* 与二穗短柄草和短花药野生稻的相似度分别是 72% 和 69%，与山羊草、图小麦、籼稻 (*Oryza sativa Indica Group*)、水稻、高粱和玉米等单子叶植物的亲缘关系较近，同源性分别达到 71%、71%、69%、68%、59% 和 57%。

2.3 RNA 质量检测

提取毛竹实生苗根、幼茎及叶片的总 RNA，无 RNA 酶的 DNaseI (TIANDZ) 消除基因组 DNA 后，紫外分光光度计测量 A_{260}/A_{280} 为 1.9 左右，通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示，均含有 3 条清晰的条带，分别是 28 S、18 S 和 5 S，如图 4 所示。

2.4 干旱处理下 *PheDof4-1* 基因表达模式

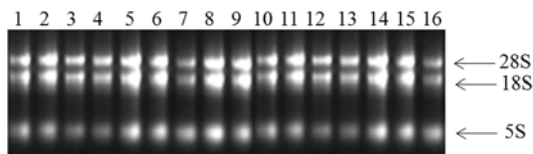
在干旱胁迫处理下，分别检测 *PheDof4-1* 基因在毛竹实生苗的根、茎和叶片中的表达情况，结果如图 5 所示：在幼茎中，*PheDof4-1* 的表达受到诱导，总体呈现先升高后降低的趋势，6 h 时表达量达到峰值，为对照的 12.88 倍，随后逐渐降低，最后恢复正常水平；然而在根中，*PheDof4-1* 的表达受到强烈抑制，转录水平急剧下降，处理 1 h 时，表达迅速降为对照的 1/50，随后持续下降。由此说明，在毛竹干旱胁迫的根中，*PheDof4-1* 的表达受到抑制，起负调控作用。在叶片中，*PheDof4-1* 的表达是先下降后升高，在处理 6 h 时降为最低，为对照的 1/50，随后，表达量逐渐升高，24 h 时恢复正常。*PheDof4-1* 在幼茎中的表达高于根和茎中，这可能与基因的组织特异性相关。



分支上的数字为 1 000 次重复搜索的靴带值
Numbers on branches indicate bootstrap estimates for 1 000 replicates

图 3 不同物种 Dof 蛋白进化树值

Figure 3 Phylogenetic tree of Dof proteins in different species



1~16 分别代表不同样本的 RNA
1-16 respectively represent different samples of RNA

图 4 毛竹 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 4 The electrophoresis of RNA of moso bamboo

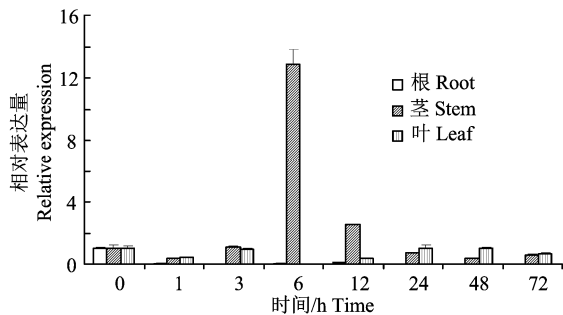


图 5 *PheDof4-1* 在干旱胁迫条件下的相对表达量

Figure 5 The relative expression of *PheDof4-1* under 20% PEG8000 treatment

2.5 盐处理下 *PheDof4-1* 基因表达模式

在盐胁迫处理下, *PheDof4-1* 在不同组织中的表达模式如图 6 所示: 在根中, *PheDof4-1* 的表达呈现先下降后上升的趋势, 在处理 1 h 时表达量最低, 仅为对照的 0.17 倍, 随后逐渐升高, 在处理 24

h 时, 表达量恢复正常, 最后趋于稳定水平; 在幼茎中, *PheDof4-1* 的转录水平随着处理时间的延长, 呈现增加的趋势, 在处理 12 h 时, 表达量达到峰值, 为对照组的 2.2 倍, 随后表达逐渐降低; 在叶片中, *PheDof4-1* 基因的表达先升高后降低, 处理 1 h 时, 表达量迅速升高, 为对照组的 2.4 倍, 随后逐渐下降, 在处理 12 h, 表达量降到最低值, 仅为对照的 3/10, 随后, 表达量逐渐上升, 恢复正常。 *PheDof4-1* 在不同组织中呈现不同的表达趋势, 说明该基因在不同组织中呈现不同的表达水平。

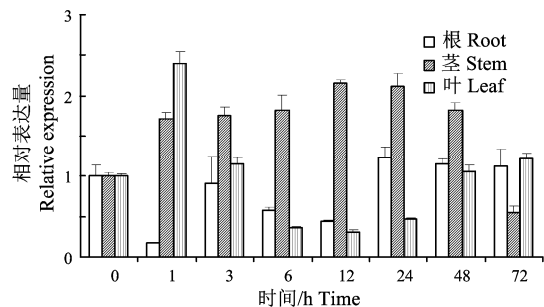


图 6 *PheDof4-1* 在盐胁迫条件下的相对表达量

Figure 6 The relative expression of *PheDof4-1* under 250 mmol·L⁻¹ NaCl treatment

2.6 冷处理下 *PheDof4-1* 基因表达模式

在冷胁迫处理下, *PheDof4-1* 基因受到诱导表达, 结果如图 7 所示。在根中, *PheDof4-1* 的表达

量急剧升高,在处理 48 h,表达量达到最大值,为对照组的 96.8 倍,随后急剧下降,降为对照组的 5.9 倍。在幼茎和叶片中, *PheDof4-1* 的转录水平有轻微的增加,均呈现先升高后降低的趋势,分别在处理 6 h 和 3 h 时达到最大值,为对照的 3.5 倍和 7.6 倍,随后逐渐降低,由此说明, *PheDof4-1* 在冷胁迫的幼茎和叶片中的功能具有相似性,并且, *PheDof4-1* 在根中的表达水平平均高于幼茎和叶片中。

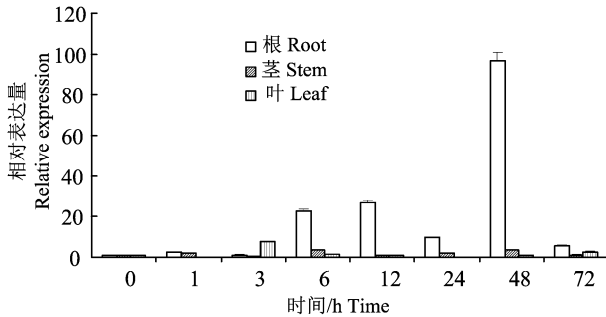


图 7 *PheDof4-1* 在冷胁迫处理下的相对表达量

Figure 7 The relative expression of *PheDof4-1* under 4°C treatment

3 讨论

毛竹是我国分布面积最大、范围最广和开发利用程度最高的竹种之一,对竹产区地方经济、竹农收入具有深远影响,然而目前造林主要以无性繁殖为主,其品种来源仅限于自然变异的选择,杂交育种一直没有实质性进展。因此,从分子水平上开展竹子开花调控的研究,对于突破常规育种的局限性,加快竹子育种进程具有重要的现实意义。Dof 蛋白是植物体内特有的一类转录因子,受多基因的共同调控,其在高等植物开花调控中所发挥的作用受到越来越多的关注。本研究分离了 1 个 *Dof* 基因,命名为 *PheDof4-1*,该基因含有保守的 zf-Dof 结构域,与水稻 *Dof* 基因家族 zf-Dof 结构域同源性非常高,具有基本相同的结构特征,含有相同的氨基酸残基和基序,在同一家族基因保守性方面发挥着决定性的作用。并且,该基因含有多个光周期调控元件,如: G-Box、GAG-motif、AE-box、ATCT-motif 和 Box II 等,说明该基因与光响应应答密切相关,因此可以通过改变光周期观察植物的功能,另外,该基因还含有非生物胁迫响应的元件,如逆境响应元件 TC-rich repeats,干旱诱导元件 MBS,此外,还存在一些与赤霉素和水杨酸等激素相关元件,如: GARE-motif、TATC-box 和 TCA-element 等,由此说明该基因可能参与多种代谢调控。

植物的 Dof 蛋白在植物生长过程中参与多种信号转导过程,如碳氮代谢、光合调控与种子储藏物质的合成、非生物胁迫等过程。许多转录因子在植物响应干旱、激素、高盐和病原等胁迫反应中起重要作用, Dof 蛋白做为转录激活子或抑制子参与调节植物的光、激素及防御反应等^[34],研究毛竹 *PheDofs* 基因的逆境响应表达谱,可以为研究相关基因在逆境胁迫下的生物学功能提供重要的理论依据。通过 qRT-PCR 技术,分析 *PheDof4-1* 基因在毛竹不同组织及不同胁迫下的表达模式。结果显示,在干旱胁迫的幼茎中转录受到诱导,但在叶片和根中表达却受到抑制;在低温胁迫的根中, *PheDof4-1* 基因的表达急剧增加,在 48 h 时表达水平最高,为对照的 96.8 倍,由此说明,该基因在毛竹冷胁迫中具有较高表达水平。但在叶片中表达量迅速下降,在处理 1 h 时,降到最低值,仅为对照的 1/20,随后逐渐恢复正常水平,说明 *PheDof4-1* 在叶片中发挥负调控作用。由此说明, *PheDof4-1* 基因主要响应干旱和冷胁迫。同一基因在不同组织和不同处理下表达模式不同,这可能与响应胁迫处理的组织及先后顺序有密切关系,进一步暗示了 *PheDof4-1* 基因可能参与多种胁迫响应,而且 *PheDof4-1* 基因在不同胁迫信号途径之间可能起交互作用。

参考文献:

- [1] YANAGISAWA S. The Dof family of plant transcription factors[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(12): 555-560.
- [2] PLESCH G, EHRHARDT T, MUELLER-ROEBER B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression[J]. Plant J, 2001, 28(4): 455-464.
- [3] HIKARU S, NAKAMURA N, MARUTANI M, et al. Molecular cloning of cDNA for a novel pea Dof protein, PsDof1, and its DNA-binding activity to the promoter of *PsDof1* gene[J]. Plant Biotechnol, 2002, 19(4): 251-260.
- [4] YANG X, TUSKAN G A. Divergence of the Dof gene families in poplar, Arabidopsis, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication[J]. Plant Biol, 2006, 142(3): 820-830.
- [5] TANAKA M, TAKAHATA Y, NAKAYAMA H, et al. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweetpotato plants overexpressing the *SRF1* gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor[J]. Planta, 2009, 230(4): 737-746.
- [6] YAN H, HUANG J, LIAO B, et al. *DOF* transcription factors in developing peanut (*Arachis hypogaea*) seeds[J]. Am J Mol Biol, 2012, 2: 60-71.
- [7] WEN C, CHENG Q, ZHAO L, et al. Identification and characterisation of *Dof* transcription factors in the cucumber genome[J]. Sci Rep-UK, 2016, 6: 23072.
- [8] 周淑芬, 颜静宛, 刘华清, 等. 水稻 *Dof* 基因家族的

- 组织表达谱及胁迫诱导表达特征分析[J]. 分子植物育种, 2012, 10(6): 635-643.
- [9] RYU J Y, HONG S Y, JO S H, et al. Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*[J]. BMC Plant Biol, 2014, 14(1): 15.
- [10] 江海洋, 骆晨, 江腾, 等. 玉米 *Dof* 转录因子家族基因的全基因组分析[J]. 生物信息学, 2010, 8(3): 198-201.
- [11] KUSHWAHA H, GUPTA S, SINGH V K, et al. Genome wide identification of *Dof* transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(8): 5037-5053.
- [12] KANG H G, SINGH K B. Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects[J]. Plant J, 2000, 21(4): 329-339.
- [13] WASHIO K. Functional dissections between GAMYB and Dof transcription factors suggest a role for protein-protein associations in the gibberellin-mediated expression of the *RAmy1A* gene in the rice aleurone[J]. Plant Physiol, 2003, 133(2): 850-863.
- [14] GUALBERTI G, PAPI M, BELLUCCI L, et al. Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds[J]. The Plant Cell, 2002, 14(6): 1253-1263.
- [15] MARZÁBAL P, GAS E, FONTANET P, et al. The maize Dof protein PBF activates transcription of γ -zein during maize seed development[J]. Plant Mol Biol, 2008, 67(5): 441-454.
- [16] AHMAD M, RIM Y, CHEN H, et al. Functional characterization of *Arabidopsis* Dof transcription factor At-Dof4.1 [J]. Russ J Plant Physiol, 2013, 60(1): 116-123.
- [17] PAPI M, SABATINI S, BOUCHEZ D, et al. Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination[J]. Gene Dev, 2000, 14(1): 28-33.
- [18] IMAIZUMI T, SCHULTZ T F, HARMON F G, et al. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*[J]. Science, 2005, 309(5732): 293-297.
- [19] GUO Y, QIN G, GU H, et al. *Dof5. 6/HCA2*, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(11): 3518-3534.
- [20] KONISHI M, YANAGISAWA S. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiol Bioch, 2007, 45(8): 623-629.
- [21] YANAGISAWA S, SHEEN J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression[J]. The Plant Cell, 1998, 10(1): 75-89.
- [22] LI D, YANG C, LI X, et al. Functional characterization of rice *OsDof12*[J]. Planta, 2009, 229(6): 1159-1169.
- [23] CHEN Y, CAO J. Comparative analysis of *Dof* transcription factor family in maize[J]. Plant Mol Biol Rep, 2015, 33(5): 1245-1258.
- [24] 张艳, 高健, 徐有明. 毛竹 β -1, 3-葡聚糖酶基因的克隆及序列分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 533-541.
- [25] 陈媛文, 高健, 张颖, 等. 水培条件下不同磷水平对毛竹实生苗生长发育的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(1): 78-84.
- [26] CUI X W, ZHANG Y, QI F Y, et al. Overexpression of a moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) transcription factor gene *PheWRKY1* enhances disease resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Botany, 2013, 91(7): 486-494.
- [27] 李雪平, 牟少华, 彭镇华, 等. 毛竹等 28 个刚竹属竹种的 AFLP 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(2): 179-182.
- [28] 李娟, 高健, 牟少华. 不同 Pb 浓度胁迫下 4 种地被竹的叶绿素荧光响应和转运积累研究[J]. 世界竹藤通讯, 2014, 12(3): 5-11.
- [29] 林二培. 早竹 *API/SQUA*-, *REV*-, *TBI*-like 基因的功能研究与竹笋 microRNAs 的克隆和表达分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [30] GAO J, ZHANG Y, ZHANG C, et al. Characterization of the floral transcriptome of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) at different flowering developmental stages by transcriptome sequencing and RNA-seq analysis[J]. PLoS one, 2014, 9(6): e98910.
- [31] GE W, ZHANG Y, CHENG Z, et al. Main regulatory pathways, key genes and microRNAs involved in flower formation and development of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15(1): 82-96.
- [32] FAN C, MA J, GUO Q, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. PLoS one, 2013, 8(2): e56573.
- [33] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [34] PARK D H, LIM P O, KIM J S, et al. The *Arabidopsis* *COG1* gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling[J]. Plant J, 2003, 34(2): 161-171.