

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.03.004

地涌金莲 *MICYP734A6* 基因的克隆与表达分析

安 静, 万友名, 马 宏, 刘雄芳, 张秀姣, 曹毓蓉, 李正红*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的] 为揭示 *CYP734A6* 基因在地涌金莲生长发育过程中的调控作用提供分子数据。[方法] 从地涌金莲转录组数据库中筛选到 1 个注释为 *CYP734A6* 的差异基因片段, 通过 3'和 5' RACE 技术克隆得到该基因的全长序列, 命名为 *MICYP734A6* (登录号为 MW013148)。利用生物信息学技术对 *MICYP734A6* 进行序列比对、分子特征分析、系统进化分析等。应用实时荧光定量 PCR 方法比较分析该基因在不同地涌金莲类型及不同组织部位中的表达量。利用高效液相色谱-质谱联用技术测定地涌金莲不同组织器官中油菜素内酯的含量。[结果] 克隆得到 1 条包含 cDNA 全长为 1 584 bp 的 *MICYP734A6* 基因序列, 其编码 527 个氨基酸, 相对分子量为 60 038.84 Da, 等电点为 9.44。所编码的氨基酸序列通过序列比对及系统进化分析, 结果显示: 与小果野蕉亚种的同源序列相似度最高, 亲缘关系最近。qRT-PCR 分析结果显示: *MICYP734A6* 基因在地涌金莲的所有组织中均有表达, 且表达量最低的部位是叶片, 表达量最高的 2 个组织部位是花序轴和根尖。地涌金莲的各个组织器官中都能检测到油菜素内酯, 且与 *MICYP734A6* 的表达水平无显著相关性, 矮秆类型的株形可能是由于过量内源油菜素内酯所致。[结论] 从地涌金莲中成功克隆了油菜素内酯的失活基因 *MICYP734A6*, 推测由于该基因参与了地涌金莲中油菜素内酯的代谢过程, 从而调控了活性油菜素内酯的含量。本研究结果可为进一步分析 *CYP734As* 对地涌金莲及其他植物的生长发育的调控机理提供理论支持。

关键词: 地涌金莲; *CYP734A6*; 油菜素内酯; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786; S682

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)03-0037-09

油菜素甾醇 (BRs) 是一类在植物生长发育过程中发挥重要调节作用的甾醇类化合物的总称, 作为植物的第六大内源激素, BRs 广泛存在于低等和高等植物中, 尤其是被子植物中, 而且存在于植物的各个组织器官中^[1-2]。目前, 从自然界分离鉴定出的 BRs 已经超过了 70 种, 其中, 被认为分布最广泛且活性最强的是油菜素内酯 (BL), 通常被人们用来指代 BRs^[3-4]。BRs 在植物整个生长发育和环境适应过程中发挥着重要的作用, 尤其调控着许多重要的农艺性状, 如植物结构、开花时间、种

子产量和抗逆性等^[5-8]。微剂量的 BRs 就可以显著促进植物生长, 但过量的 BRs 则抑制植物的生长发育, 因此, 维持和调节内源 BRs 水平对植物的最佳生长发育状态至关重要^[9]。植物的生长发育主要受环境因素和各种植物激素的调控, 已有多篇文献证明油菜素内酯与不同的植物激素如生长素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯、赤霉素、茉莉酸、多胺、水杨酸等相互作用, 引发植物代谢及其生长发育的各种反应^[10]。对 BRs 的研究近 10 多年一直呈逐年上升的态势^[11]。

收稿日期: 2020-12-31 修回日期: 2021-02-24

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2019ZB007); 云南省“万人计划”青年拔尖人才项目 (YNWR-QNBJ-2019-010)

* 通讯作者: 李正红, 研究员, 博士生导师, 主要从事野生花卉资源收集、保存与利用。E-mail: LZH4949@163.com

由于 BRs 不能进行组织和器官间的长距离运输, 所以 BRs 的生物合成和分解代谢是维持 BRs 在植物体内稳态含量的两个关键拮抗过程^[12-13]。目前, 几乎完整的 BRs 生物合成及代谢途径已经被解析出来^[14-16]。BRs 代谢通路上最关键的失活基因 *CYP734As* 已经在多种植物中被挖掘及研究^[17-22]。*CYP734As* 基因属于细胞色素 P450 酶家族, 在 BRs 失活过程中发挥着关键作用, 可以催化 BL 和 粟甾酮 (CS) 的 C26 位置上发生羟基化, 使 BRs 失活, 从而下调植物体内活性 BRs 水平^[8, 23]。*BASI/CYP734A1* 是第一个被研究报道出来对 BRs 失活有明确羟基化作用的基因, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中过表达 *AtCYP734A1* 可导致植物体内 BRs 含量下降, 植株出现极度矮化、叶片紧缩的表型^[17]。而后, 该基因的同源基因在其他植物中被陆续研究报道, 番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill) 中的 *CYP734A7*、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 中的 *PAG1*、胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 中的 *DcBASI* 以及水稻 (*Oryza sativa* L.) 中的 *CYP734As*, 都被研究证实了具有使 BRs 失活的功能^[18-20, 22]。内源活性 BRs 具有反馈机制, 当含量多时会下调合成基因和上调代谢基因, *CYP734As* 的上调表达通常是由于 BRs 的反馈调控引起的^[24]。*CYP734As* 基因还受到其他影响因子的正负调控, 有报道称, *BASI* 基因的表达受到转录因子 BZR1 和生长素响应因子 ARF7 的反向调控, 二者都与 *BASI* 启动子中的相同 motifs 结合, ARF7 可抑制 *BASI* 的表达或促进 BRs 生物合成基因 *DWF4* 的表达, 来增加内源性 BRs 含量^[25]。

地涌金莲 (*Musella lasiocarpa* (Franchet) C. Y. Wu ex H. W. Li.) 是中国金沙江河谷流域的特有珍稀单种属植物, 属于芭蕉科 (Musoidae) 地涌金莲属 (*Musella*), 具有优美奇特的莲座状花序及端正笔挺的株形, 文化及观赏价值极高。本研究组率先找到了几处地涌金莲野生种群, 从中发现了株高、苞片颜色、吸芽数量等性状的不同变异类型, 并注册登记了 5 个地涌金莲新品种^[26-27]。笔者从前期高秆和矮秆 2 个无性系的转录组数据库中发现, 与 BRs 代谢相关的 *CYP734A6* 基因的表达水平在矮秆品系中显著高于高秆品系, 由此推测, 地涌金莲植株高矮性状可能与 *CYP734A6* 基因的差异表达导致 BRs 含量不同相关。为进一步探究地涌金莲

中 *CYP734A6* 基因的相关信息及表达规律, 本研究克隆得到了 *MICYP734A6* 基因的 cDNA 序列全长, 并对其编码蛋白的理化性质、结构特征和系统进化进行了分析, 同时应用 qRT-PCR 分析了 *MICYP734A6* 基因在不同地涌金莲类型及不同组织部位中的表达模式, 并与油菜素内酯含量做了相关性分析, 以期探究 *MICYP734A6* 基因在地涌金莲生长发育过程中的调控作用提供分子依据, 对今后采用分子手段培育不同株形性状新品种也具参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料种植于中国林业科学研究院资源昆虫研究所位于云南省禄丰县的滇中高原试验站。以地涌金莲矮秆类型 (RD05) 和高秆类型 (YN01) 为试验材料, 二者均为来自于单株的组培苗无性系。2019 年 5 月, 从定植 3 a 的 2 个无性系中各随机选择 30 株调查平均株高, 测量数据 (RD05: 21.50 ± 4.31 cm, YN01: 54.74 ± 6.06 cm) 显示二者存在极显著差异 ($p < 0.01$); 各随机选择 3 株长势健壮的初花期植株, 分别取每株的苞片、花序轴 (假茎中间的茎秆)、叶、吸芽芽点及根尖 5 个部位为样品, 每个部位至少 3 g, 采集的样品立即放入液氮中, 随后保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 采用 CTAB 法^[28] 提取地涌金莲样品总 RNA; 采用 1.0% 琼脂凝胶电泳和 NanoDrop2000 微量分光光度计检测 RNA 质量; 按照 Fermentas 公司的反转录试剂盒 VRevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书中的步骤合成 cDNA 第一链。

1.2.2 *MICYP734A6* 基因的克隆 根据本研究组前期地涌金莲转录组信息 (材料来源与本研究相同), 在油菜素内酯代谢通路上筛选到 1 个注释为 *CYP734A6* 的显著差异基因片段, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 条特异性扩增引物 QA029F2 和 QA029R1 (表 1)。以 RD05 的 5 个部位材料等量混合提取 RNA 后反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系为: $2 \times \text{PCR Buffer for KOD FX Neo } 25.0 \mu\text{L}$, $\text{dNTP Mix } (10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}) 1.0 \mu\text{L}$, $\text{KOD FX Neo } (1 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}) 1.0 \mu\text{L}$, $\text{cDNA 第一链 } 5.0 \mu\text{L}$, $\text{ddH}_2\text{O } 15.0 \mu\text{L}$, 正反引物各 $1.5 \mu\text{L}$ 。PCR

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')	功能 Function
QA029F2	AGAACAAGAAGGATACAGGGA	扩增
QA029R1	GCTAAGTACAATGACGTGAT	Amplification
AJ17F	ACGTTCTGTGTGGTTTGG	荧光定量PCR
AJ17R	ACCAATCCCTCACCTTCGAG	qRT-PCR
TUBAF	TCTCCTTCTCCATTCCC	内参基因 qRT-PCR
TUBAR	GCATCAACTATCAGCCACC	qRT-PCR primer for reference gene

扩增程序为: 98℃ 预变性 5 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂凝胶电泳检测合格, 回收目的条带, 使用 TaKaRa 公司的 T4 连接酶试剂盒进行连接后, 4℃ 过夜, 采用感受态细胞进行转化, 获得阳性克隆后交由上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.3 *MICYP734A6* 基因的生物信息学分析 应用 NCBI 网站中的 ORF finder 和 CDD 功能查找克隆获得的全长序列的开放阅读框和保守结构域; 应用 ExPasy 网站 (<https://www.expasy.org/>) 中的 ProtParam 和 ProtScale 在线软件分析蛋白的理化性质和亲疏水性; 应用 DTU.dk 网站 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) 中的 SignalP5.0、NetPhos3.1 和 TMHMM2.0 在线软件预测蛋白的信号肽、磷酸化位点和跨膜结构; 使用 BUSCA (<http://busca.biocomp.unibo.it/>) 和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 在线软件预测蛋白的亚细胞定位和蛋白的二级结构模型; 应用 DNAMAN8.0 软件进行氨基酸序列比对; 应用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Neighbor-joining) 进行系统进化分析, 以上在线分析软件的设置系数皆为系统默认值。

1.2.4 *MICYP734A6* 基因的实时荧光定量分析 根据地涌金莲 *MICYP734A6* 基因全长序列设计出 1 对荧光定量特异性引物 AJ17F 和 AJ17R, 扩增产物长度为 146 bp, 以地涌金莲 TUBA 为内参基因, 设计内参引物 TUBAF 和 TUBAR, 扩增产物长度为 190 bp (表 1)。分别以地涌金莲 RD05 和 YN01 的苞片、花序轴、叶、吸芽芽点及根尖部位的 cDNA 为模板, 对 *MICYP734A6* 进行定量表达分析。仪器为 BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量

PCR 检测系统, 采用 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® Cat: 4367659) 试剂盒, 反应体系为 20 μL, 反应程序为: 95.0℃ 预变性 3 min; 95.0℃ 10 s, 55.0℃ 20 s, 72.0℃ 20 s, 75.0℃ 5 s, 40 个循环。每个样品设置 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行数据分析, 利用 SPSS 软件中的 ANONA 模块进行 Duncan 多重比较法进行数据的显著性差异分析。

1.2.5 油菜素内酯的提取与检测 取地涌金莲 RD05 和 YN01 各 3 株的苞片、花序轴、叶、吸芽芽点及根尖 5 个部位为油菜素内酯检测材料, 每个部位至少 3 g, 交由南京卡文思检测技术有限公司采用高效液相色谱-质谱联用方法 (HPLC-MS/MS) 进行 BL 含量测定, 每个样品重复 3 次。检测浓度带入公式: BL 含量 ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) = 检测浓度 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) × 体积系数 (mL) / 质量系数 (g), 式中体积系数为 0.20 mL, 质量系数为样品实际称取质量。应用 SPSS 软件中的双变量相关性计算方法, 计算皮尔逊相关系数 r 值和显著性 P 值, 对 *MICYP734A6* 及油菜素内酯含量进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 地涌金莲 *MICYP734A6* 基因的克隆及生物信息学分析

以地涌金莲 RD05 的 cDNA 为模版, 应用特异性引物对目的基因进行 PCR 扩增, 电泳结果显示: 在位于 1 000~2 000 bp 间有 1 条与预期大小相符的条带, 经回收、测序后, 显示该片段实际大小为 1 639 bp (图 1)。结合 3' 和 5' RACE 技术, 拼接出地涌金莲 *CYP734A6* 的基因序列全长, 命名为 *MICYP734A6* (GenBank 登录号 MW013148)。该基因全长为 1 936 bp, 其中, 5' 非编码区长度为

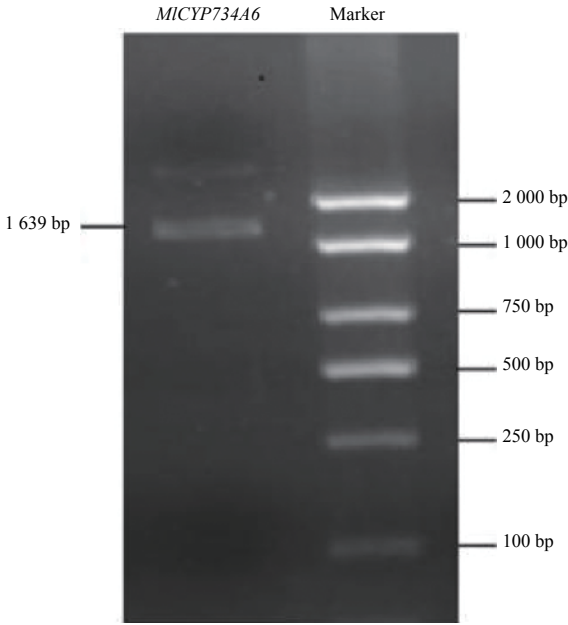


图1 MICYP734A6的PCR扩增产物
Fig. 1 PCR amplification of MICYP734A6

131 bp, 3'非编码区长度为 221 bp, 包括长度为 118 bp 的 polyA 尾巴 (图 2)。

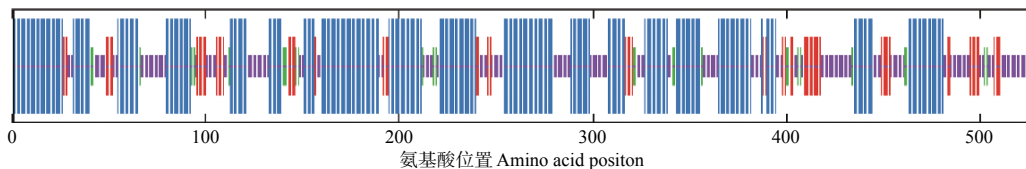
MICYP734A6 包含 1 个长度为 1 584 bp 的完整开放阅读框, 编码 527 个氨基酸, 存在 1 个细胞色素 P450 蛋白家族结构域。TMHMM 在线预测该蛋白在 7~29 氨基酸残基位置存有 1 个螺旋跨膜区域; SignalP5.0 在线预测无信号肽位点, 属于非分泌性蛋白质; BUSCA 在线预测蛋白亚细胞定位于细胞质膜; 蛋白二级结构预测结果显示, 该蛋白包含 51.04% 的 α -螺旋、12.14% 的延长链、5.31% 的 β -折叠和 31.50% 的无规则卷曲 (图 3)。理化性质分析结果推测出, MICYP734A6 蛋白的分子式为 $C_{2728}H_{4287}N_{751}O_{737}S_{20}$, 相对分子量为 60 038.84 Da, 等电点为 9.44, 酸性氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 54, 碱性氨基酸残基总数 (Arg+Lys) 为 67, 稳定性系数为 44.32, 属于不稳定蛋白, 脂肪系数为 94.00; ProtScale 在线分析结果显示, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.111, 推测 MICYP734A6 为亲水性蛋白 (图 4A); 磷酸化位点预测结果显示, 磷酸化位点有 40 处, 其中, 丝氨酸 19 处、苏氨酸 17 处、酪氨酸 4 处 (图 4B)。

```

1      AGAGATATACAGCTTGGTTGAGACAAGAGGAAGGGAACGACAGCGGAGAAGAATGCTTCTGTTTGGTTTCATTATGTATATAGGT
91     GGTAGAGGAAGAAGAATAAGAACAAGAAGGATACAGGGACGATGGGGGATGCAGTGACATGGTTCTGTCTGGTTTCCTCGGGTTGT
30     M G D A V T W F L S V S S G L
181    GCATGTTTCATGGTCTGAAGCTTTTGGATTATTTATGGTGGAGGCCAAAGAGACTGGAGCATCACTTCGCGAGTCAAGGICATAAGGGGAC
60     C M F M V L K L L D Y L W R P K R L E H H F A S Q G G I A R G
271    CCCCTTACCGCTTTTGTAGGTGTGTCAAAGAGATGGTGGCTTGATGTTGGAGGTCTCTTCCACGCGATGGTGCTCAAACCTCTC
90     P P Y R F F V G C V K E M V G L M L E V S S T P M V P Q T S
361    ATGACATTCCTCCCAAGAGTTCTCTCTTACCACCCTGGAGGAAGATCTATGGTCTACGTTCCTGTTGTTGGTGGCCGACGGCTC
120    H D I L P R V L S F Y H H W R K I Y G S T F L W F G P T A
451    GCATCACCATCGCCGACCCGGACCTGATCCGAGAAATATCTTGACGCGGGCGGAGTCTTCGATCGCTACGAATCCCAACCCCTGGTCC
150    R I T I A D P D L I R E I F L T R A E F F D R Y E S H P L V
541    GGCAGCTCGAAGGTGAGGTATTGGTGAACCTTAGAGGACAGAAATGGCTCAGCACAGAAAGATCCCTTCTCCAACATTTACATGGAGA
180    R Q L E G E V L V N L R G Q K W A Q H R K I L S P T F H M E
631    ATATCAAATTCGTGATACCGTGTGATCGGGAAGACGGTACAGGGAATGGTGGAGAAATGCCAGCCTCGGCGAGGTAGAGATCGAGCTCT
210    N I K L L I P L I G K T V Q G M V E K L P A S G E V E I D V
721    CCGAATGGTTCAGGAGGTAAACCGAGTATGCCATCAGGAGCGGCATGGGTCGTAGTACGATGATGGCAAGGACGCTTCCAATTC
240    S E W F Q E V T E Y A I T R T A L G R S Y D G D V F H M E
811    AGACCAAGCAGATGGTCTTTCAGCCGAGGCAATTCGCAAGGTTTTCATCCCTGGTTACAGATCTTCCCACGAAGAAGACACGATGT
270    Q T K Q M V F A A E A F R K V F I P G Y R F F P T K K N T M
901    CGTGGAGACTAGACAAGGAGATCAGGAGGGTCTCATCCGCTGATCCGCGCAGCAAAGAGAGCTCGGATGACGAGAACGCTGGCCGCC
300    S W R L D K E I R R G L I A L I R R R K E S S D E A K P G G
991    GACACGAGAAGGATCTTTACGGCTGATGATCAACGCAAGCGCGTCAATCGCCGGGGGGATCACCACAGGCGACATGGTGGAGGAGTCA
330    R H E K D L L R L M I N A S A S S P G G I T T G D M V E E C
1 081  AGACGTTCTTCTTCGCGGGAAGCAGACCACGTCGAACCTCCTGACGTGGGCGACGGTGTCTCGCCATGCACCCGGAGTGGCAGGAGC
360    K T F F A G A G K Q T T S N L L T W A T V L L A M H P E W Q E
1 171  GCGCGGAGCGGAGGTCTTACGGTGTGCGGCTCAGTGACATCCCAACCCGCGACCACTGGCCGAGCTCAAGACGCTCGGTCTCATTC
390    R A R A E V L Q V C G S R D I P T R D H L A E L K T L G L I
1 261  TTAACGAGACGTTGCGGTTGTACCCGCGGAGTGGCGACCATACGGCGCGAAAGCTGACGTTGGAGTCCGAGACTACCGGATTCAC
420    L N E T L R L Y P P A V A T I R R A K A D V E I G D Y R I P
1 351  GCGGCACCGACTTGTCTATCCCAATCATCGCGTCCACCAGATGAGAGACTGTGGGCGCCGACGTCGACCGGTTTCGATCCGGGCGGTT
450    R G T D L L I P I I A V H H D E R L W G P D V D R F D P G R
1 441  TCGCGGAGGGGTGAGCCGAGCGGCTCGCTCCGACCGCATTACATCCCTCGGGCTTGGAGGTCGAGGCTGACGCTGACGCTGACGCTGG
480    F A E G V S R A A L R P T A F I P F G L G G R T C I G Q N L
1 531  CGTGTCTGTGGCCAGGCTCACCCTCGCCATCATCTCCAACGCTCTCTTCCGCTCTCTCCGACTACGTTACGCGCCGAGCCGTT
510    A L L V A R L T L A I L Q R S S F R L S P G Y V H A P T V
1 621  TGATGCTTGTATCCGAGTACGGTGCACCCATCTCTCCGACCCGCCCCATCACAGCGTCCCTCAATCTTGCCACAATATCT
540    L M L L Y P Q Y G A P I L F R T R P P S Q P S P Q S C H N I
1 711  CGTGATGGGGTCTACTACTAAAGTATTATCGCTTATGTACTTAGCTTAATGTGTGTCAAACAGGGATTAGTGGAATAATAGAAAA
570    S *
1 801  ACAAGGCTTTTCGACGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1 891  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图2 地涌金莲 MICYP734A6 基因的核苷酸序列及编码的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA sequence and amino acid sequence coded of MICYP734A6



注: 蓝色: α -螺旋; 粉色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链; 绿色: β -折叠

Notes: Blue: alpha helix; Pink: random coil; Red: extended strand; Green: beta sheet

图3 *MICYP734A6* 蛋白的二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure prediction of *MICYP734A6*

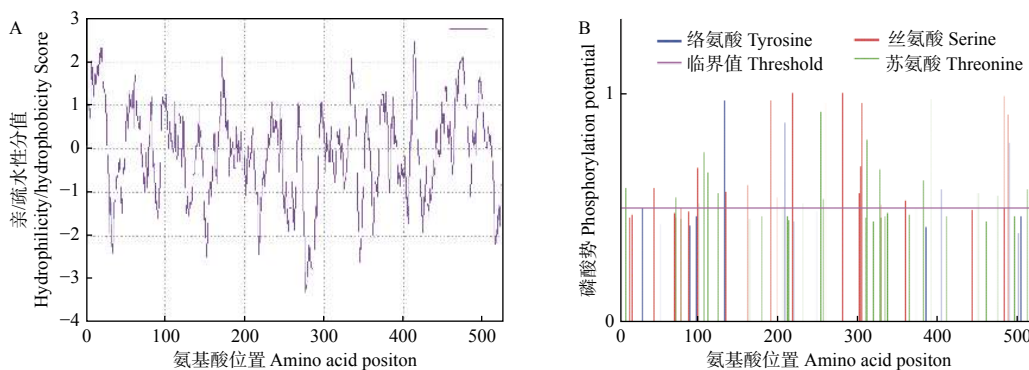


图4 *MICYP734A6* 的亲/疏水性分析和磷酸化位点分析

Fig. 4 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis and phosphorylation sites analysis of *MICYP734A6*

2.2 氨基酸序列比对及系统进化分析

将地涌金莲 *MICYP734A6* 编码的氨基酸序列与其他植物进行比对, 发现与多种植物的相似性达到75%以上, 其中, 与小果野蕉亚种 (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*) 的相似性最高, 达到94.69%, 其次是凤梨 (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 和油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.), 分别为73.66%和73.33%。应用 DNAMAN8.0 软件将 *MICYP734A6* 氨基酸序列与相似度比较高的几种植物进行比对分析, 显示这几种植物均存在1个结构相似的细胞色素 P450 蛋白家族结构域 (图5)。

为了分析 *CYP734A6* 在不同植物间的亲缘关系, 应用 MEGA6.0 软件, 采用 Neighbor-joining 方法将地涌金莲 *MICYP734A6* 与其他14种植物的同源蛋白进行系统进化分析, 聚类结果显示, 地涌金莲 *MICYP734A6* 与小果野蕉亚种和油棕的同源蛋白遗传关系最近, 而与黍 (*Panicum halli* Vasey.)、谷子 (*Setaria italica* (L.) Beauv.) 等单子叶植物遗传关系较远 (图6)。

2.3 *MICYP734A6* 基因的表达模式分析

运用实时荧光定量 PCR 检测 *MICYP734A6* 基因在不同地涌金莲类型和不同组织部位中的相对表达量, 结果 (图7) 表明: *MICYP734A6* 基因在2种

类型地涌金莲的所有组织中均有表达且相对表达量差异显著 ($p < 0.05$), 矮秆类型地涌金莲 RD05 的花序轴中 *MICYP734A6* 的相对表达量最高, 为15.722, 其次是根尖、苞片和吸芽芽点, 最低的部位是叶片, 仅为0.907; 高秆类型 YN01 中, 根尖中的相对表达量最高, 为2.589, 其次是苞片、花序轴、芽点, 最低的部位也是叶片, 仅为0.444。2种类型地涌金莲同一组织部位的比较分析结果显示, RD05 在各个组织部位的相对表达量皆高于 YN01, RD05 的花序轴、根尖、苞片、吸芽芽点和叶片的相对表达量分别是 YN01 的14.13、5.08、4.47、1.28、2.04 倍。

2.4 油菜素内酯含量测定及与 *MICYP734A6* 基因表达量水平的相关性分析

为了分析 *MICYP734A6* 表达水平与油菜素内酯含量的相关性, 笔者采用 HPLC-MS/MS 分别测定了2种类型地涌金莲5个组织部位的 BL 含量, 检测结果 (图8) 显示: 地涌金莲的5个组织部位皆能检测出 BL, 但不同组织中 BL 含量差异显著。在 YN01 中, 叶片中的 BL 含量最高, 为 $0.032 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 其次是根尖、芽点、苞片和花序轴, 分别是 0.014、0.009、0.006、 $0.003 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 在 RD05 中, 苞片中

MICYP734A6MGDAVTWFLSLVSSGLCMFVMLKLLDYLWVWPKRLEBHFASQGIKGGPPYRFVGCVREMVLMLEASSRKPM	72
XP_009409325.1MGDAVTWFLSLVSSGLCMFVMLKLLDYLWVWPKRLEBHFASQGIKGGPPYRFVGCVREMVLMLEASSRKPM	72
OAY77576.1	MGAWAWAWAWAWMVMVAVRVAASVYVAVVAVKVAEVLWVWPKRLEBHFASQGIKGGPPYRFVGCVREMVLMLEASSRKPM	90
XP_010925254.1MGEMVWVWVFLPLGSMVYVCLAMALRLDLVWVWPKRLEBHFASQGIKGGPPYRFVGCVREMVLMLEASSRKPM	76
XP_020196421.1MMGQWVWIAAAAALAYVAAKLMEVWVWPKRLEBHFASQGIKGGPPYRFVGCVREMVLMLEASSRKPM	69
Consensus	llww p r e hf qgirgppyrf gcv emv lm s pm	
细胞色素 P450 结构域_CytochromeP450 domain		
MICYP734A6	PQTSHTDILPRVLAFYHHWKIYGSTFLWFGPTARITLADPOLIREIFLTRAFFRYESHPLVRLQEGVLYNLRGKWAHRRKLTSE	161
XP_009409325.1	PQTSHTDILPRVLAFYHHWKIYGSTFLWFGPTARITLADPOLIREIFLTRAFFRYESHPLVRLQEGVLYNLRGKWAHRRKLTSE	161
OAY77576.1	PQTSHTDILPRVLAFYHHWKIYGSTFLWFGPTARITLADPOLIREIFLTRAFFRYESHPLVRLQEGVLYNLRGKWAHRRKLTSE	179
XP_010925254.1	PQNSHTDILPRVLAFYHHWKIYGSTFLWFGPTARITLADPOLIREIFLTRAFFRYESHPLVRLQEGVLYNLRGKWAHRRKLTSE	165
XP_020196421.1	PPYRSHVNLPRVLAFYHHWKIYGSTFLWFGPTARITLADPOLIREIFLTRAFFRYESHPLVRLQEGVLYNLRGKWAHRRKLTSE	159
Consensus	p sh lprvl fyhwhkiygstfl wfgpt r i t l a d p o l i r e i f l t r a f f r y e s h p l v r l q e g v l y n l r g k w a h r r k l t s e	
MICYP734A6	FFHMDNLELPLGKTVGQVVEKLPASG.....EVEIDVSEWFCVTEVAITRTALGSYDGGKAVFLQTKQWVFAEAFRKVIPGV	246
XP_009409325.1	FFHMDNLELPLGKTVGQVVEKLPASG.....EVEIDVSEWFCVTEVAITRTALGSYDGGKAVFLQTKQWVFAEAFRKVIPGV	246
OAY77576.1	FFHMDNLELPLGKTVGQVVEKLPASG.....EVEIDVSEWFCVTEVAITRTALGSYDGGKAVFLQTKQWVFAEAFRKVIPGV	268
XP_010925254.1	FFHMDNLELPLGKTVGQVVEKLPASG.....EVEIDVSEWFCVTEVAITRTALGSYDGGKAVFLQTKQWVFAEAFRKVIPGV	253
XP_020196421.1	FFHMDNLELPLGKTVGQVVEKLPASG.....EVEIDVSEWFCVTEVAITRTALGSYDGGKAVFLQTKQWVFAEAFRKVIPGV	249
Consensus	f h m n l e l p l g k t v g q v v e k l p a s g e v e i d v s e w f c v t e v a i t r t a l g s y d g k a v f l q t k m a e a f r k v i p g v	
MICYP734A6	RFPTKNTMSWLDKEIRRGGLIALIRRRRESSE...DEKPGGRHERKDLLRLMINASA.....SPGGITITG	310
XP_009409325.1	RFPTKNTMSWLDKEIRRGGLIALIRRRRESSE...DEKPGGRHERKDLLRLMINASA.....SPGGITITG	310
OAY77576.1	RFPTKNTMSWLDKEIRKHLVRLTGRRRRESSESASAGEKPDGKRAKDLLGLMINARPPSLAG.....KGGDC.....DRSAAAITVQ	346
XP_010925254.1	RFPTKNTMSWLDKEIRKMLALIRRRRESSE...NEKPDGKRAKDLLGLMINASTKKAPSPSSSSTSGHRRPTTTRTTSASPTITVQ	338
XP_020196421.1	RFPTKNTMSWLDKEIRKMLVTLTGRRRRESSE...DEKPGKRAKDLLGLMINASA.....NGGRR.....GQVSPITITVQ	318
Consensus	r f p t k n t m s w l d k e i r r g g l i a l i r r r r e s s e d e k p g g r h e r k d l l r l m i n a s a s p g g i t i t g	
MICYP734A6	DMVEECKTFVFAKQKTSNLLTWATVILAMHPWQERARAEVLVCGGSRDIPTRDHLAELKTGLINLNETLRLYPPAVATRRKADVEL	400
XP_009409325.1	DMVEECKTFVFAKQKTSNLLTWATVILAMHPWQERARAEVLVCGGSRDIPTRDHLAELKTGLINLNETLRLYPPAVATRRKADVEL	400
OAY77576.1	DMVEECKTFVFAKQKTSNLLTWATVILAMHPWQERARAEVLVCGGSRALPTRDHLAELKTGLINLNETLRLYPPAVATRRKADVEL	436
XP_010925254.1	DMVEECKTFVFAKQKTSNLLTWATVILAMHPWQERARAEVLVCGGSRDIPTRDHLAELKTGLINLNETLRLYPPAVATRRKADVEL	428
XP_020196421.1	DMVEECKTFVFAKQKTSNLLTWATVILAMHPWQERARAEVLVCGGSRDIPTRDHLAELKTGLINLNETLRLYPPAVATRRKADVEL	408
Consensus	d m v e e c k t f v f a k q k t s n l l t w a t v i l a m h p w q e r a r a e v l v c g g s r d i p t r d h l a e l k t g l i n l n e t l r l y p p a v a t r r k a d v e l	
MICYP734A6	GGVRIIPRGTDLIPITIAVHHDRLWGPVDRFDFGRFAGGVSRAALRPTAFIPFGLGRTVIGQNALLARLTLATILQRSSFRLSFAN	490
XP_009409325.1	GGVRIIPRGTDLIPITIAVHHDRLWGPVDRFDFGRFAGGVSRAALRPTAFIPFGLGRTVIGQNALLARLTLATILQRSSFRLSFAN	490
OAY77576.1	GGVRIIPRGTDLIPITIAVHHDRLWGPVDRFDFGRFAGGVSRAALRPTAFIPFGLGRTVIGQNALLARLTLATILQRSSFRLSFAN	526
XP_010925254.1	GGVRIIPRGTDLIPITIAVHHDRLWGPVDRFDFGRFAGGVSRAALRPTAFIPFGLGRTVIGQNALLARLTLATILQRSSFRLSFAN	518
XP_020196421.1	GGVRIIPRGTDLIPITIAVHHDRLWGPVDRFDFGRFAGGVSRAALRPTAFIPFGLGRTVIGQNALLARLTLATILQRSSFRLSFAN	498
Consensus	g y i p r t l i p i t i a v h h d r l w g p v d r f d f g r f a g g v s r a a l r p t a f i p f g l g r t v i g n a l l a r l t l a t i l q r s s f r l s f a n	
MICYP734A6	VHAPTVMMLLPQYGAPILFRTRPPSQPSPQSCHNIS...	527
XP_009409325.1	VHAPTVMMLLPQYGAPILFRTRPPSQPSPQSCHNIS...	526
OAY77576.1	VHAPTVMMLLPQYGAPVFRPLPPDPSDPPAAPRYR...	563
XP_010925254.1	VHAPTVMMLLPQYGAPILFRSLSPSPSLPSDPHPTGV...	558
XP_020196421.1	VHAPTVMMLLPQYGAPVFR...SRSSQTPDRHV...	531
Consensus	v h a p t v m l m l p q y g a p i l f r t r p p s q p s p q s c h n i s	

注: MICYP734A6 地涌金莲; XP_009409325.1 小果野蕉亚种; OAY77576.1 凤梨; XP_010925254.1 油棕; XP_020196421.1 节节麦

Notes: MICYP734A6. *Musella lasiocarpa*; XP_009409325.1. *Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*; OAY77576.1. *Ananas comosus*; XP_010925254.1 *Elaeis guineensis*; XP_020196421.1 *Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*

图 5 地涌金莲与其他植物的 CYP734A6 氨基酸序列比对

Fig. 5 The alignment of amino acid sequences of CYP734A6 in *M. lasiocarpa* and other plants

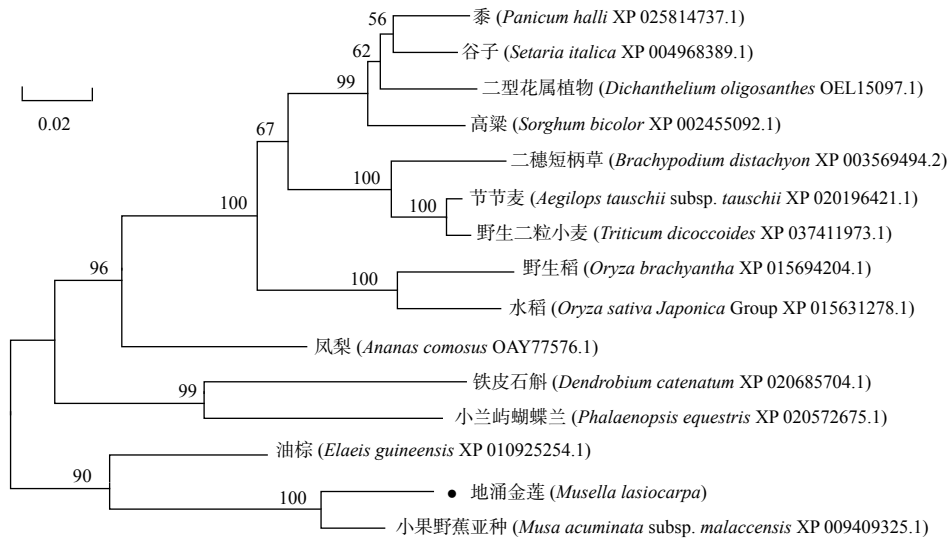
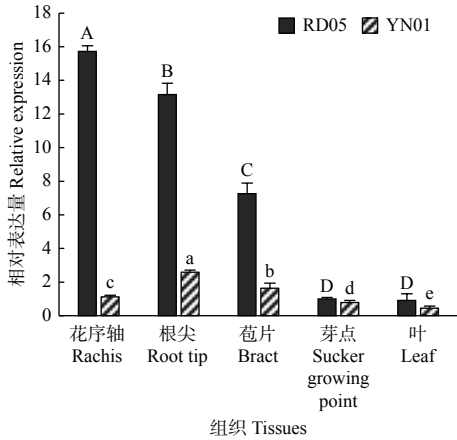


图 6 地涌金莲 MICYP734A6 与其同源序列的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of MICYP734A6 of *M. lasiocarpa* and its homologous

的 BL 含量最高, 为 0.067 ng·g⁻¹, 其次是花序轴、芽点、叶片和根尖, 分别是 0.056、0.035、0.008、

0.007 ng·g⁻¹。结合 MICYP734A6 的表达模式分析, YN01 中的 MICYP734A6 基因在叶中的表达水平最



注: 不同大写字母表示 RD05 不同组织间的差异显著性 ($p < 0.05$); 不同小写字母表示 YN01 不同组织间的差异显著性 ($p < 0.05$)。下同。

Notes: Capital letters indicate significant differences among different tissues of RD05 ($p < 0.05$), normal letters indicate significant differences among different tissues of YN01 ($p < 0.05$). The same below.

图 7 *MICYP734A6* 在不同类型地涌金莲各组织中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *MICYP734A6* in different tissues of *M. lasiocarpa*

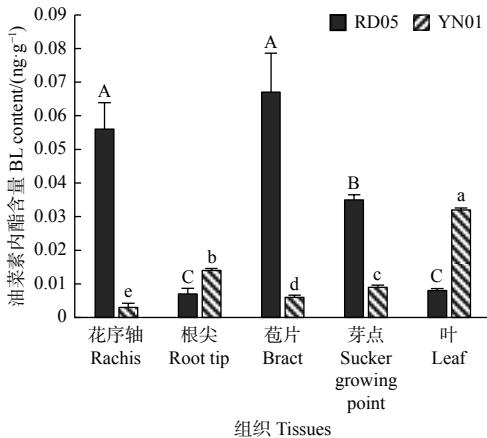


图 8 不同类型地涌金莲不同组织中的 BL 含量

Fig. 8 The content of BL in different tissues of *M. lasiocarpa*

低, 但 BL 含量却最高, 而 *MICYP734A6* 在花序轴的表达量较高, 但 BL 含量却最低; 在 RD05 中, 花序轴中 *MICYP734A6* 表达水平最高, 但 BL 含量也较高, 叶片中 *MICYP734A6* 表达水平最低, BL 含量也非常低。通过 SPSS 软件对不同组织中 *MICYP734A6* 基因表达水平和 BL 的相关性进行分析, 计算结果 (YN01: r 值 0.568, p 值 0.318; RD05: r 值 -0.212, p 值 0.732) 显示, 二者之间不存在显著相关性。

3 讨论

本研究成功地从地涌金莲中克隆到 1 个油菜素内酯代谢通路上的失活基因 *MICYP734A6*, 通过多序列比对及系统进化分析, 结果显示该基因编码的 *MICYP734A6* 蛋白与同为芭蕉科的小果野蕉亚种的同源蛋白具有 94.69% 的高相似性, 并且与其他植物的 *CYP734As* 进行比对, 显示都具有细胞色素 P450 蛋白家族结构域, 说明 *CYP734As* 在生物演变过程中是高度保守的, 即 *MICYP734A6* 可能具有与其他 *CYP734As* 类似的使 BRs 羟基化的功能。

对地涌金莲 *MICYP734A6* 基因在不同株高类型地涌金莲中的表达模式分析发现, *MICYP734A6* 在地涌金莲不同组织部位的表达水平差异显著, 2 种类型地涌金莲分别在花序轴和根尖中的表达水平最高, 这一结果与马铃薯 *StCYP734A1* 和水稻 *CYP734A6* 的表达模式类似, *StCYP734A1* 在马铃薯的根中的表达水平最高, 其次是茎, 而水稻 *CYP734A6* 也是在茎节中的表达水平最高^[21, 29]。 *MICYP734A6* 在地涌金莲中的这种表达模式与棉花中的 *PAG1* 基因的表达模式相反, 在地涌金莲中, *MICYP734A6* 在花序轴和根尖中的表达水平最高, 而在叶中的表达水平最低, 而在棉花中, *PAG1* 在根部和茎部的表达水平最低, 在叶片中的表达水平最高^[18]。由此可见, *CYP734As* 基因在不同植物中的表达模式不尽相同, 可能是由于 BRs 在不同植物的不同组织器官中行使着不同的功能, 所以导致调控 BRs 含量的代谢基因 *CYP734As* 的表达模式差异很大。

分析 HPLC-MS/MS 检测结果可知, BL 在地涌金莲各个组织器官中均可检测到, 且含量差异显著, 但与 *MICYP734A6* 表达水平无显著相关性。在 YN01 中, 叶中的 *MICYP734A6* 表达水平最低, 而 BL 含量却最高, 花序轴中 *MICYP734A6* 的表达水平较高, 而 BL 含量却最低, 说明 *MICYP734A6* 可能在 YN01 的花序轴的 BRs 代谢通路上起到重要的代谢调控作用, 主效下调着 BRs 含量的积累; 而在 RD05 中, 苞片中的 BL 含量最高, 而 *MICYP734A6* 的表达水平有也较高, 是 YN01 的 14.13 倍, 推测苞片中 BRs 合成基因的表达水平可能比较高, 与代谢基因 *MICYP734A6* 共同调控着 BRs 含量水平, 而且 *MICYP734A6* 在 RD05 中的高表达水平可能也受到了高含量 BRs 的反馈上调调控^[24]。

高秆类型 YN01 的平均株高是矮秆类型 RD05

的 2.57 倍, 结合地涌金莲转录组数据, 前期分析筛选出 BRs 生物合成代谢途径中有 3 个显著差异 Unigene, 分别注释为合成通路中的 *CYP90A1/CPD*、*CYP90B1/DWF4* 和代谢通路中的 *CYP734A6*, 而信号转导通路中没有显著差异基因, 这 3 个 Unigene 均是在 RD05 中显著上调, 其中, *CYP734A6* 基因的表达量最高, 显著差异性最大, 结合 RD05 的矮秆表型, 故初期推测 RD05 中的 BL 含量应较低, 但 HPLC-MS/MS 检测结果与前期预测不符, 检测结果显示, RD05 花序轴中的 BL 含量是 YN01 的 18.67 倍。推测可能的原因是, 虽然 RD05 中的代谢基因 *CYP734A6* 显著上调, 可使 BRs 含量下降, 但合成通路中 2 个合成基因的显著上调发挥更大的调控作用, 导致合成量高于代谢量, 在花序轴中积累了过量的 BRs。由于 BRs 具有双向调控的功能, 缺乏或过量都会抑制植株生长, 但目前对于过量 BRs 抑制植物生长的分子机理还尚未解析^[29], 所以推测地涌金莲 RD05 的矮化表型, 可能是由于过量的内源 BRs 所致。植物的整个生长发育过程中, 激素间的协同互作发挥着重要作用^[30-31]。当 BRs 含量较高时, 可抑制赤霉素的合成, 从而抑制植物生长^[29]。ABA 作为植物生长抑制激素, 虽然 BRs 在某些植物生理反应的调控中与 ABA 存在拮抗关系, 但当 BRs 含量升高时, 可上调若干个 ABA 响应基因和 ABA 生物合成基因^[32]。故不排除其他激素对地涌金莲株高上的影响。所以接下来可以对不同类型地涌金莲在不同生长阶段进行全激素含量检测分析, 并结合转录组数据进行激素和调控基因间的交互分析, 为后续利用分子生物学技术改造地涌金莲株形提供参考数据。

4 结 论

本研究成功克隆了地涌金莲 *MICYP734A6* 基因, 并分析了其编码蛋白的序列结构及蛋白特性, 明确了 *MICYP734A6* 在地涌金莲中的表达模式, 分析了油菜素内酯与株高的关系。本研究结果为后续应用转基因或 RNAi 技术等调控 *MICYP734A6* 的表达来平衡地涌金莲中油菜素内酯含量, 进而为地涌金莲的生长发育水平奠定了分子基础, 也为研究 *CYP734As* 在其他植物中的调控作用提供理论数据。

参 考 文 献:

[1] Yokota T, Ohnishi T, Shibata K, *et al.* Occurrence of brassinosteroids in non-flowering land plants, liverwort, moss, lycophyte and

fern[J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 46-55.

- [2] Bajguz A, Tretyn A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(7): 1027-1046.
- [3] 李 辉, 左钦月, 涂升斌. 油菜素内酯生物合成和代谢研究进展[J]. *植物生理学报*, 2015, 51 (11): 1787-1798.
- [4] Yang C, Zhang C, Lu Y, *et al.* The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development[J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(4): 588-600.
- [5] Wei Z, Li J. Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(1): 86-100.
- [6] Nolan T M, Vukasinovic N, Liu D, *et al.* Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(2): 295-318.
- [7] 周扬焜, 廖锦涛, 丁先锋, 等. 芸苔素内酯调控植物生长发育及抗逆性的研究进展[J]. *农业科学*, 2020, 10 (6): 407-418.
- [8] Wei Z, Li J. Regulation of brassinosteroid homeostasis in higher plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 583622.
- [9] Clouse S D, Langford M, McMorris T C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(10): 671-678.
- [10] Saini S, Sharma I, Pati P K. Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 950.
- [11] 刘少金, 肖正强, 吴照祥. 基于Web of Science的油菜素甾醇研究态势分析[J]. *农业图书情报学报*, 2020, 32 (6): 49-57.
- [12] Ye H, Li L, Yin Y. Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(6): 455-468.
- [13] Zhao B, Li J. Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(10): 746-759.
- [14] Bajguz A, Chmur M, Gruszka D. Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1034.
- [15] Wang Z, Bai M, Oh E, *et al.* Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis[J]. *Annual Review of Genetics*, 2012, 46(1): 701-724.
- [16] Gruszka D. Genetic and molecular bases of brassinosteroid metabolism and interactions with other phytohormones[M] // *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, 2019: 219-249.
- [17] Neff M M, Nguyen S M, Malancharuvil E J, *et al.* *BAS1*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(26): 15316-15323.
- [18] Yang Z, Zhang C, Yang X, *et al.* *PAG1*, a cotton brassinosteroid catabolism gene, modulates fiber elongation[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(2): 437-448.
- [19] Ohnishi T, Nomura T, Watanabe B, *et al.* Tomato cytochrome P450 CYP734A7 functions in brassinosteroid catabolism[J]. *Phytochem-*

- istry, 2006, 67(17): 1895-1906.
- [20] Sakamoto T, Kawabe A, Tokida-Segawa A, *et al.* Rice CYP734As function as multisubstrate and multifunctional enzymes in brassinosteroid catabolism[J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(1): 1-12.
- [21] 张 杰, 邓孟胜, 蔡诚诚, 等. 马铃薯*SlCYP734A1*基因克隆、表达模式及生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(15): 4883-4893.
- [22] Que F, Wang Y, Xu Z, *et al.* *DcBAS1*, a carrot brassinosteroid catabolism gene, modulates cellulose synthesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(49): 13526-13533.
- [23] Meaney S. Is C-26 hydroxylation an evolutionarily conserved steroid inactivation mechanism?[J]. *Faseb Journal*, 2005, 19(10): 1220-1224.
- [24] Tanaka K, Asami T, Yoshida S, *et al.* Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 1117-1125.
- [25] Youn J H, Kim M K, Kim E J, *et al.* ARF7 increases the endogenous contents of castasterone through suppression of *BAS1* expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Phytochemistry*, 2016, 122: 34-44.
- [26] 潘庆杰. 地涌金莲种群遗传多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [27] 侯健华. 地涌金莲组织培养中的褐化抑制研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [28] 郝宏刚, 李志英, 丛汉卿, 等. 牛大力总RNA提取的CTAB法改进及优化[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(18): 165-166.
- [29] 邹其珍. 四个水稻油菜素内酯降解相关基因的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [30] 周晓艺, 薛红卫. 生长素与油菜素甾醇相互作用机制的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(12): 1047-1053.
- [31] De Vleeschauwer D, Van Buyten E, Satoh K, *et al.* Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(4): 1833-1846.
- [32] Divi U K, Rahman T, Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 151-164.

Cloning and Expression Analysis of *MICYP734A6* in *Musella lasiocarpa*

AN Jing, WAN You-ming, MA Hong, LIU Xiong-fang, ZHANG Xiu-jiao, CAO Yu-rong, LI Zheng-hong

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To provide data in molecular-level for revealing the regulatory role of *MICYP734A6* in the growth and development of *Musella lasiocarpa*. [Method] The 3' and 5' RACE technology was used to clone the full length cDNA of *MICYP734A6* gene. The software of bioinformatics was used to analyze the nucleotides and protein sequence. Real-time PCR method was used to analyze the gene expression level in different types and tissues of *Musella lasiocarpa*. HPLC-MS/MS was used to detect the brassinolide content in different tissues. [Result] The full length cDNA of *MICYP734A6* is 1 584 bp, encoding 527 amino acids. The relative molecular mass of coding protein is 60 038.84 Da and the isoelectric point is 6.61. Sequence comparison and phylogenetic tree analysis showed that the amino acid sequence of *MICYP734A6* had the closest evolutionary relationship with the *CYP734A6* protein of *Musa acuminata* subsp. *malaccensis*. Real-time PCR analysis showed that *MICYP734A6* could be detected in all tissues. The two tissues with the highest expression level were rachis and root tip, and the lowest expression level was in leaf. No significant correlation was found between the brassinolide content and the expression pattern of *MICYP734A6*, and excessive brassinosteroids in RD05 was a possible cause of dwarfed phenotype. [Conclusion] The study indicated that *MICYP734A6* may participate in the metabolism of brassinosteroids, and balance the bioactive brassinosteroids content in *Musella lasiocarpa*. These results provide further theoretical support for the role of *CYP734As* in plant growth and development in the future.

Keywords: *Musella lasiocarpa*; *CYP734A6*; brassinosteroid; cloning; expression analysis