果 树 学 报 2021,38(3):318-324
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20200377

荔枝*LcBES1*的克隆、表达及功能分析

王 弋[1],杨 蕊[2],董 晨[1],魏永赞[1],郑雪文[1],李伟才[1*]

([1]中国热带农业科学院南亚热带作物研究所•农业农村部热带果树生物学重点实验室,广东湛江 524091;[2]云南农业大学热带作物学院,云南普洱 665099)

摘 要:【目的】基于荔枝花穗RNA-seq数据,克隆荔枝BR信号途径的*LcBES1*,并对其序列特征、表达特点、基因功能及亚细胞定位进行分析。**【方法】**利用qRT-PCR对*LcBES1*在不同组织中的表达进行研究,利用MEGA 6软件进行系统进化树分析。通过转基因分析其在拟南芥中的基因功能,利用烟草瞬时转化系统分析其亚细胞定位。**【结果】**荔枝*LcBES1* ORF长984 bp,编码327个氨基酸,具有经典的BES1_N结构域。qRT-PCR结果表明,*LcBES1*在果肉中的表达量最高,其次为果皮、根和茎,而在花、花穗和叶片中的表达量较低。转基因实验表明,*LcBES1*能够部分恢复拟南芥BR受体功能缺失突变体*bri1*的矮小表型,且可在细胞核位置观察到荧光信号。**【结论】***LcBES1*是一个典型的*BES1*编码基因,编码蛋白定位于细胞核;*LcBES1*在荔枝果肉中高表达,*LcBES1*是油菜素内酯信号途径的正调控因子。

关键词:荔枝;*LcBES1*;油菜素内酯;表达模式;植物激素

中图分类号:S667.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2021)03-0318-07

Cloning, expression and functional analysis of the *LcBES1* in *Litchi*

WANG Yi[1], YANG Rui[2], DONG Chen[1], WEI Yongzan[1], ZHEN Xuewen[1], LI Weicai[1*]

(*[1]South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang 524091, Guangdong, China; [2]College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665099, Yunnan, China*)

Abstract:【Objective】Brassinosteroids (BRs) are plant steroid hormones known for promoting cell elongation. The BRs regulate diverse developmental and physiological processes including flowering, seed germination, vascular differentiation, senescence, photomorphogenesis, male fertility and responses to biotic and abiotic stresses in plants. In the recent decades, BR signaling network have been revealed and several key components in the BR signaling pathway have been identified. The *BRI1-EMS-SUPPRESSOR1* (*BES1*) is one of the most important transcription factors acting as a positive regulator in the BR signal transduction pathway. In the presence of the BRs, the *BIN2* is inactivated by the *BSLs*, and the *BES1* is rapidly dephosphorylated by protein phosphatase 2A and accumulate in the nucleus where they can bind to the promoter of downstream genes. The *BES1* has been well studied in model plants such as *Arabidopsis* and rice, but in *Litchi* the function of the *BES1* has not been studied. To investigate the BR signaling pathway in *Litchi* (*Litchi chinensis* Sonn.), we identified a *BES1* homolog in *Litchi* and named it as *LcBES1*. In order to clarify the function of the *LcBES1*, the sequence characteristics, gene function, expression pattern, phylogenetic tree and subcellular localization were all analyzed.【Methods】The *LcBES1* was obtained according to the RNA-seq data of panicle [National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Achieve accession number SRX2336010] and the

收稿日期:2020-09-24 接受日期:2020-12-03

基金项目:海南省自然科学基金(320QN321);中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630062020031);国家现代农业(荔枝龙眼)产业技术体系(CARS-032)

作者简介:王弋,男,助理研究员,研究方向为荔枝花穗发育调控。Tel:0759-2859112,E-mail:wangyi30626@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0759-2859112,E-mail:lwc-619@163.com

full length ORF was predicted through Open Reading Frame Finder software (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). The total RNA was isolated from the different organs or tissues using EasyPure Plant RNA Kit (TransGen Biotech, China) according to the manufacturer's protocol. To digest DNA, RNase-free DNase I (NEB, USA) was used before reverse transcription. First-strand cDNA was then synthesized from the total RNA using EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (Transgen Biotech, China). Semi-quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression pattern of the *LcBES1* in the different tissues and organs in *Litchi* (including root, stem, leaf, panicle,flower, pulp and pericarp). The relative expression level was calculated using the $2^{-\triangle\triangle Ct}$ method, and *LcACTIN* was used as internal reference. The multiple alignment analysis of LcBES1 and AtBES1 proteins was carried out using the AlignX program within the Vector NTI. The phylogenetic tree of BES1 proteins among *Litchi*, *Arabidopsis* and other fruit trees was constructed using the neighbor joining method in the MEGA 6.06 software. To investigate the function of the *LcBES1*, the entire coding region of *the LcBES1* was transferred into pCAMBIA2300 vector, and then the fusion construct was transformed into the *Agrobacterium* strain GV3101 using the freeze-thaw method, and finally GV3101 was transformed into the *Arabidopsis bri1* mutant. To monitor the subcellular localization of the *LcBES1* protein, the ORF of the *LcBES1* was inserted into the C-terminus of pCAMBIA2300-YFP vector with the Seamless Assembly Cloning Kit (TransGen Biotech). The construct was then transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 using the freeze-thaw method and then introduced into tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves by infiltration.【Results】The *BES1* homolog in *Litchi* was identified according to the annotation of the *Litchi* panicle transcriptome data (GenBank accession number SRX2336010), the isolated gene was named as *LcBES1* based on the phylogenetic analysis. Molecular analysis indicated that the ORF of the *LcBES1* was 984 bp in length and the deduced polypeptides was 327 amino acids. Multiple sequence alignment showed that the *LcBES1* protein had 55.0% similarity with the *AtBES1*. Structural domain analysis showed that a BES1_N domain commonly associated with the *BES1* function was identified at the N-terminus of the protein. qRT-PCR results demonstrated that the transcripts of the *LcBES1* were detected in multiple tissues, but most highly detected in the pulps, relatively lowly in the roots, and the stems, and most lowly detected in the pericarps, the leaves, the flowers and panicles. The transgenic experiment showed that the *LcBES1* significantly promoted plant growth. The height of *Arabidopsis bri1* mutant was 6 cm (40 days seedling), while the height of the *bri1* mutant overexpressed the *LcBES1* could reach 15cm, the result demonstrated that the *LcBES1* could partly rescue the dwarf phenotype of *bri1* mutant. In the transient transformation assays in tobacco, fluorescence signals could be observed in the nucleus, indicating that the *LcBES1* is a nuclear localized protein.The phylogenetic tree analysis showed that the the *BES1* proteins of fruit trees were clustered into one group, while the *BER1/BES1* family of *Arabidopsis* were clustered into the other group. In the fruit trees group, it could be found that the *LcBES1* had the closest evolutionary relationship with the *BES1* protein from durian.【Conclusion】In this study, the homolog of the *BES1* transcription factors was identified in *Litchi* and denoted as *LcBES1*. The transient expression experiment in tobacco confirmed that *LcBES1* was a nucleus located protein. The function analysis showed that the *LcBES1* had similar biological functions as the *BES1*. The expression analysis showed that the *LcBES1* expressed in all of the tissues and organs detected, indicating that the *LcBES1* was a ubiquitous expression gene. The results demonstrated that the function of the *LcBES1* was conserved and the *LcBES1* was a positive regulator of the BR signal pathway.

Key words: *Litchi*; *LcBES1*; Brassinosteroid; Expression pattern; Phytohormone

油菜素内酯(brassinosteroid,BR)是一种天然的植物甾体激素,最早在油菜花粉提取物中被鉴定,此后在种子、果实、叶片及茎秆等组织中均有发现[1-3]。油菜素内酯参与调控植物各个阶段的生长发育过程,如种子萌发、气孔形成、植物形态的形成、开花、衰老。此外,在响应生物和非生物胁迫中也有重要作用。在水稻生产中,油菜素内酯可调控株高、叶片夹角、种子大小及分蘖数量等。在果树生产中油菜素内酯可调控坐果、改善品质、提高抗逆性等[4-5]。

近年来,随着遗传学、分子生物学及组学的发展,模式植物中BR信号途径中的关键组分先后被鉴定,功能也逐个被解析。根据现有BR信号通路模型,BR信号首先被其位于细胞表面的受体激酶BRASSINOS-TEROID INSENSITIVE1(BRI1)感知,随后与其共受体激酶BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1(BAK1)或SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1(SERK1)形成二聚体[6-7]。此后BRI1磷酸化两类质膜锚定的细胞质激酶BRAS-SINOSTEROID-SIGNALING KINASE1(BSK1)和CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1(CDG1)。磷酸化的BSK1和CDG1进一步磷酸化磷酸酶BRI1-SUPPRESSOR1(BSU1),而BSU1则使得GSK3- like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2(BIN2)去磷酸化并将其失活[8-10]。当BR浓度较低时,BIN2可磷酸化BRASSINAZOLE RESISTANT1(BZR1)和BRI1- EMS-SUPPRESSOR1(BES1)两个转录因子,并抑制其DNA结合能力。当BR含量较高时,BIN2失活,而BZR1和BES1则被PROTEIN PHOSPHA-TASE 2A(PP2A)去磷酸化。非磷酸化的BZR1和BES1则在细胞核内积累并激活下游BR信号途径响应基因表达[8,11]。

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)是原产于我国华南地区的特色果树,其产业在华南各省区农业和农村经济发展中占有重要地位[12]。但是坐果差、产量低的问题一直困扰荔枝生产。生产中发现,在小果发育阶段,以油菜素内酯处理花穗可改善荔枝坐果,并显著提高产量[13]。目前对油菜素内酯调控荔枝坐果已有一定研究,但是对荔枝油菜素内酯信号途径组分的研究还是空白。利用分子生物学对油菜素内酯途径关键基因*LcBES1*进行研究,有助于从分子水平揭示油菜素内酯作用机制,并为开发高效的花穗调控技术提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

试验所用材料为种质资源圃种植的18 a(年)树龄、树势健壮的'妃子笑/怀枝'砧穗组合荔枝结果树。2018年4月,取生长情况良好的'妃子笑'根、茎、叶、花穗、雌花、雄花、果皮等组织,经液氮冷冻处理后于−80 ℃保存,用于后续RNA提取及qRT-PCR分析。

1.2 *LcBES1*序列的克隆及载体构建

以荔枝各部位RNA混样为材料,反转录获得cDNA。根据前期RNA-seq获得的*LcBES1*序列进行基因特异引物的设计,设计的引物序列为LcBES1-F:catttggagaggacagggtaccc ATGACATCAGGAGGATCAG和LcBES1- R: AGGTCGACTCTAGAGGATCCCCTTATGCA CGCGTCTTGGTAG。PCR扩增体系为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 40 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,36个循环;72 ℃ 10 min。回收基因片段后,利用同源重组,将其克隆至pCAMBIA2300和pCAMBIA2300-YFP载体。

1.3 *LcBES1*系统发育树构建

在NCBI数据库中下载梨(*Pyrus* spp.)、樱桃(*Cerasus* spp.)、枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)、榴莲(*Durio zibethinus* Murr.)、橙(*Citrus sinensis*)及葡萄(*Vitis vinifera* L.)等蔷薇科、鼠李科、芸香科、木棉科和葡萄科等木本和藤本果树的*BES1*同源基因,以及模式植物拟南芥的6个BZR1/BES1家族成员。利用MEGA 6软件中的Neighbor- joining工具构建LcBES1蛋白序列的系统发育树,Bootrap检验的重复值设置为1000。

1.4 *LcBES1*在荔枝不同组织中的表达分析

利用全式金公司EasyPure Plant RNA Kit试剂盒提取'妃子笑'根、茎、叶、花穗、雌花、雄花、果皮等7个组织的RNA,并以EasyScript One-Step RT-PCR SuperMix反转录试剂盒合成第1链cDNA。反转录所用RNA浓度统一调整为0.5 μmol·L^{-1},每个反转录反应使用1 μmol·L^{-1} RNA。定量引物利用Primer Premier 5.0软件进行设计,qRT-PCR反应在ABI 7500Real-Time PCR System上进行,数据用$2^{-\triangle\triangle CT}$法进行数据处理。利用SPSS软件的Duncan法进行差异显著性分析。所有试验均设3次重复,选用*LcAC-*

TIN 作为内参。所用引物序列为 LcBES1RTF：GCTACAATACCAGAATGTGATGAGTCTG，LcBES1RTR：TTATGCACGCGTCTTGGTAG。

1.5　*LcBES1* 拟南芥转基因表型分析

采用农杆菌介导的侵染方法，首先将携带有目的基因的 *pCAMBIA2300* 载体转入 GV3101 农杆菌，随后将农杆菌侵染拟南芥 *bri1* 突变体花序，继续培养直到收获种子。将烘干后的种子平铺于含有 20 μg·mL^{-1} 卡那霉素的 1/2MS 培养基中进行筛选，挑选阳性苗进行种植，40 d 后对种植小苗进行株高统计并拍照[14]。

1.6　*LcBES1* 蛋白亚细胞定位分析

采用农杆菌介导的侵染方法，首先将携带有目的基因的 *pCAMBIA2300-YFP* 载体转入农杆菌，随后将农杆菌侵染拟南芥花序，继续培养直到收获种子。将种子平铺于含有 20 μg·mL^{-1} 卡那霉素的 1/2MS 培养基中进行筛选，挑选阳性苗种植或于激光共聚焦下观察根系荧光信号[14]（激发波长为 488 nm，发射波长为 515 nm）。

2　结果与分析

2.1　*LcBES1* 的鉴定及分离

依据对前期荔枝花穗 RNA-seq 数据的注释，鉴定到一个拟南芥 *BES1* 的同源基因 *LcBES1*。该基因 CDS 全长为 984 bp，编码 327 个氨基酸。结构域的分析结果发现，在该蛋白 N 端 5~130 氨基酸位置存在 1 个典型的 BES1_N 结构域，该结构域的存在表明其属于 BES1/BZR1 蛋白家族。氨基酸序列比对发现荔枝 LcBES1 蛋白与拟南芥 AtBES1 蛋白具有 55.0% 的相似度（图 1）。蛋白序列的高度相似性及关键结构域的存在暗示 *LcBES1* 很可能具有与拟南芥 *AtBES1* 相似的功能。

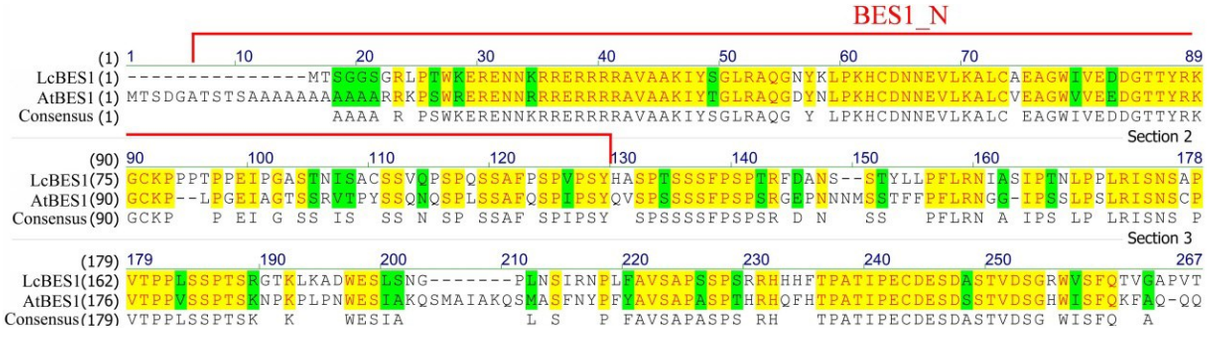


图 1　荔枝 LcBES1 蛋白与拟南芥 AtBES1 蛋白的序列比对

Fig. 1　Alignments of litchi LcBES1 and *Arabidopsis* BES1 protein

2.2　*LcBES1* 的表达分析

基因的表达特异性与其功能密切相关，为了明确 *LcBES1* 的表达特点，对荔枝根、茎、叶、花、花穗、果肉和果皮等 7 个组织进行 qRT-PCR 检测。分析的结果显示，在所检测的各组织中 *LcBES1* 均有表达，但也表现出表达水平的差异性。结果显示，*LcBES1* 在荔枝果肉中的表达量最高，为其他部位的 2 倍以上，其次为果皮、根和茎，而在花、花穗和叶片中的表达水平较低（图 2）。该结果表明，*LcBES1* 很可能参与果肉、果皮、根和茎等组织和器官的生长发育。

2.3　LcBES1 蛋白系统进化树分析

为了研究 LcBES1 蛋白的系统进化关系，利用

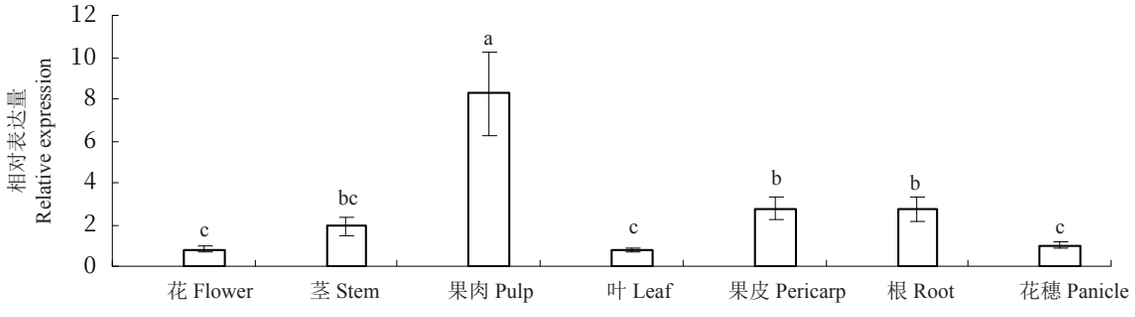
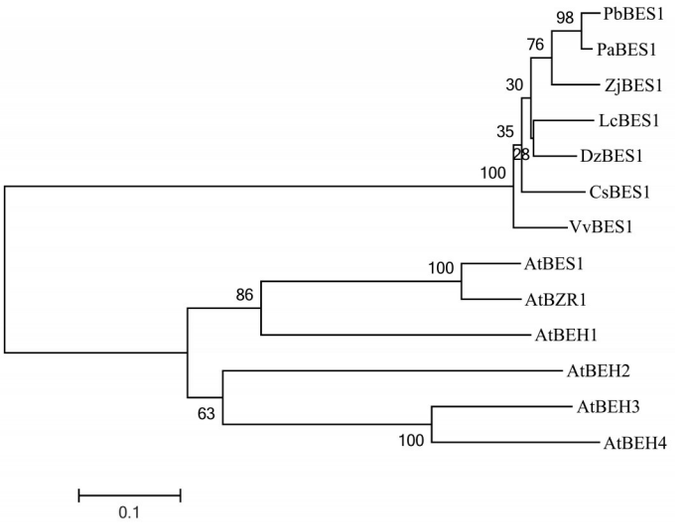


图 2　*LcBES1* 在不同组织和器官中的表达

Fig. 2　Expression profiles of *LcBES1* in different tissues

Neighbor-joining分析法对6个拟南芥BZR1/BES1家族成员以及榴莲、梨、葡萄和柚子等果树的BES1蛋白进行分析[15]。分析结果（图3）显示，荔枝的*LcBES1*与蔷薇科的梨和樱桃、鼠李科的枣、芸香科的橙、木棉科的榴莲以及葡萄科的葡萄中的同源基因具有较近的遗传进化关系，与拟南芥的遗传进化关系较远。在果树中，榴莲的DzBES1与荔枝LcBES1进化关系最近。



At. 拟南芥；Lc. 荔枝；Pb. 梨；Pa. 樱桃；Zj. 枣；Dz. 榴莲；Cs. 橙；Vv. 葡萄。

At. *Arabidopsis thaliana*; Lc. *Litchi chinensis* Sonn.; Pb. *Pyrus bretschneideri*; Pa. *Prunus avium*; Zj. *Ziziphus jujuba*; Dz. *Durio zibethinus*; Cs. *Citrus sinensis*; Vv. *Vitis vinifera*.

图3 荔枝与其他物种BES1蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of BES1 proteins in litchi and other species

2.4 *LcBES1*的功能分析

为了分析*LcBES1*的功能，在拟南芥油菜素内酯受体*Bri1*的功能缺失突变体*bri1*中进行*LcBES1*的过表达，明确其是否具有与*AtBES1*相似的作用。利用同源重组的方法将*LcBES1*构建入pCAMBIA2300过表达载体，将重组载体命名为*35S:LcBES1*，随后将*35S:LcBES1*转化*bri1*突变体。对T3代单拷贝纯合阳性株系进行表型的统计分析。利用卡那霉素筛选及PCR鉴定，共得到18株阳性克隆，随机挑选其中3个株系进行表型分析及统计。发现在*bri1*突变体中过表达*LcBES1*后，植株生长情况相比*bri1*突变体显著改善，株高显著提高。

从图4可以看出野生型（*Col-0*）的拟南芥平均株高为32 cm，*bri1*突变体平均株高为6 cm，而在*bri1*

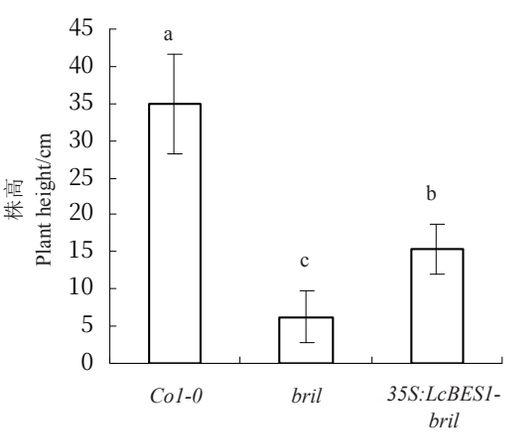


图4 拟南芥转基因分析

Fig. 4 The phenotype of transgenic *Arabidopsis*

突变体中过表达 *LcBES1* 可使植株平均高度提高至15 cm。转基因实验表明过表达 *LcBES1* 能够部分恢复 *bri1* 突变体的矮小表型，也说明 *LcBES1* 具有 *AtBES1* 类似的功能，能够激活油菜素内酯信号途径。

2.5　LcBES1蛋白的亚细胞定位分析

蛋白的亚细胞定位与其功能有密切联系，为了明确LcBES1蛋白的亚细胞定位，将 *LcBES1* 构建入带有YFP标签的pCAMBIA2300-YFP载体，命名为 *35S:LcBES1-YFP*。

随后利用农杆菌花序侵染法侵染拟南芥，通过筛选及后代种植获得T3代纯合株系。取T3代纯合种子灭菌后于1/2MS培养基上萌发，7 d后取小苗在激光共聚焦下对根进行荧光信号观察。如图5所示，在根系的细胞核位置有清晰可见的荧光信号，表明LcBES1蛋白定位于细胞核。该结果与拟南芥LcBES1蛋白的亚细胞定位结果一致。

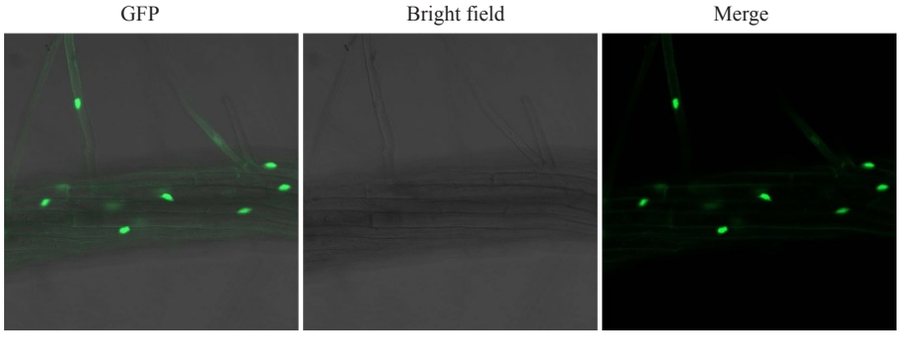


图5　LcBES1蛋白的亚细胞定位

Fig. 5　Subcellular localization of LcBES1

3　讨　论

油菜素内酯是一种广泛分布于植物的高活性甾醇类植物激素，在几乎所有植物组织中均有分布。在作物生产中，油菜素内酯可增强营养生长，促进果实增大，增加穗粒数，增强抗逆性[16-17]。油菜素内酯在果树生产中也有重要作用，例如可促进荔枝、火龙果、苹果和柑橘等果树的坐果，提高产量[18-21]。尽管油菜素内酯在促进荔枝坐果中具有重要的作用，但是目前对荔枝中该信号途径组分的研究依然很少。*AtBES1* 是油菜素内酯信号通路的植物特异转录因子，能够正调控油菜素内酯信号途径，在植物生长发育调控中具有重要作用[21]，对该基因的功能进行研究，有助于揭示油菜素内酯调控荔枝生长发育的分子机制。

AtBES1 家族在拟南芥中的表达具有组织特异性，有研究表明，*AtBES1* 家族在莲座叶、下胚轴和维管组织中表达量较高，而在茎、果实和花中的表达量较低[21-22]。笔者发现 *LcBES1* 在荔枝不同组织中的表达水平也存在较大差异，其中在根和茎中的表达量较高，与其在拟南芥中 *AtBES1* 的表达情况一致。此外，*LcBES1* 在荔枝果肉中的表达量非常高，暗示其在荔枝果肉发育中也起到重要作用。

生物信息学分析结果表明，*LcBES1* 与拟南芥 *AtBES1* 的蛋白序列具有55.0%的相似度，且在蛋白N端均具有典型的BZR/BES1蛋白所具有的BES1_N功能结构域，暗示 *LcBES1* 可能具有与拟南芥 *AtBES1* 相似的功能。*BES1* 功能获得型突变 *bes1-D* 表现出持续的油菜素内酯信号，且可恢复油菜素内酯受体 *bri1* 突变体植株矮小的表型[21,23]。笔者在 *bri1* 突变体背景下过表达 *LcBES1*，转基因株系的株高显著高于 *bri1* 突变体，虽然未恢复至野生型水平，但已表明 *LcBES1* 可部分恢复 *bri1* 突变体的矮化性状。以上结果说明，*LcBES1* 可促进拟南芥生长并恢复由油菜素内酯信号缺失造成的矮化。

4　结　论

鉴定到一个拟南芥 *AtBES1* 的同源基因 *LcBES1*。该基因编码蛋白与AtBES1蛋白具有55.0%的相似度，且具有典型的BES1_N结构域，亚细胞定位于细胞核。qRT-PCR结果表明，该基因在检测的各荔枝组织和器官中均有表达，其中在果肉中的表达量最高，其次为果皮、根和茎，而在花、花穗和叶片中的表达量较低。在拟南芥中的异源转基因实验表明，该基因能够恢复拟南芥油菜素内酯受体 *bri1* 突变体表型，即 *LcBES1* 是油菜素内酯途径的正调控因子。

参考文献 References:

[1] SCHUMACHER K，CHORY J. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors[J]. Current Opinion in Plant Biology，2000，3(1): 79-84.

[2] GROVE M D，SPENCER G F，ROHWEDDER W K，MANDAVA N，COOK J L C. Brassinolide，a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen[J]. Nature，1979，281(5728): 216-217.

[3] YOKOTA T. The structure，biosynthesis and function of brassinosteroids[J]. Trend Plant，1997，2(4): 137-143.

[4] 杨照渠，刘才宝，夏鋆彬 . 油菜素内酯的生理效应及其在果树上的应用[J]. 北方园艺，2007(5)：20-21.
YANG Zhaoqu，LIU Caibao，XIA Yunbin. Physiological effects of brassinosteroids and its application on fruit trees[J]. Northern Horticulture，2007(5)：20-21.

[5] WANG Z Y，BAI M Y，OH E，ZHU J Y. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis[J]. Annual Review of Genetics，2012，46(1): 701-724.

[6] SHE J，HAN Z，KIM T W，WANG J，CHENG W，CHANG J，SHI S，WANG J，YANG M，WANG Z Y，CHAI J. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1[J]. Nature，2011，474(7352): 472-476.

[7] HOTHORN M，BELKHADIR Y，DREUX M，DABI T，NOEL J P，WILSON I A，CHORY J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1[J]. Nature，2011，474(7352): 467-471.

[8] BELKHADIR Y，JAILLAIS Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling[J]. The New Phytologist，2015，206(2): 522-540.

[9] LI J，NAM K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY- like kinase[J]. Science，2002，295(5558): 1299-1301.

[10] ZHAO J，PENG P，SCHMITZ R J，DECKER A D，TAX F E，LI J. Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling[J]. Plant Physiology，2002，130(3): 1221-1229.

[11] WANG W，BAI M Y，WANG Z Y. The brassinosteroid signaling network-a paradigm of signal integration[J]. Current Opinion in Plant Biology，2014，21: 147-153.

[12] 余华荣，周灿芳，万忠，刘序，陈厚彬 . 2015 年广东荔枝产业发展形势与对策建议[J]. 广东农业科学，2016，43(4)：21-24.
YU Huarong，ZHOU Canfang，WAN Zhong，LIU Xu，CHEN Houbin. Development situation and countermeasures of Guangdong litchi industry in 2015[J]. Guangdong Agricultural Sciences，2016，43(4)：21-24.

[13] 陈厚彬，欧良喜，李建国，苏钻贤，杨胜男，吴振先，胡卓炎 . 新中国果树科学研究 70 年：荔枝[J]. 果树学报，2019，36(10)：1399-1413.
CHEN Houbin，OU Liangxi，LI Jianguo，SU Zuanxian，YANG Shengnan，WU Zhenxian，HU Zhuoyan. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: Litchi[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(10)：1399-1413.

[14] CHEN X B，YAO Q F，GAO X H，JIANG C F，HARBERD N P，FU X D. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition[J]. Current Biology，2016，26(5): 640-646.

[15] WANG Y，SUN S Y，ZHU W J，JIA K P，YANG H Q，WANG X L. Strigolactone/max2- induced degradation of brassinosteroid transcriptional effector bes1 regulates shoot branching[J]. Developmental Cell，2013，27(6): 681-688.

[16] 李程，梁宝魁，王晓峰 . 油菜素内酯提高蔬菜作物抗逆性的研究进展[J]. 中国蔬菜，2015(11)：12-18.
LI Cheng，LIANG Baokui，WANG Xiaofeng. Research progress of brassinolide on improving stress resistance of vegetable crops [J]. China Vegetables，2015(11)：12-18.

[17] 吕习栋，袁留斌 . 油菜素内酯研究进展[J]. 农业灾害研究，2013，3(1)：56-57.
LÜ Xidong，YUAN Liubin. Research progress of brassinosteroids[J]. Journal of Agricultural Catastropholog，2013，3(1): 56-57.

[18] 张格成，卿雨文，刘开银，何全正，唐才禄 . 荔枝幼果期喷布芸薹素提高产量和品质的效果[J]. 中国南方果树，1999，28(2)：35.
ZHANG Gecheng，QING Yuwen，LIU Kaiyin，HE Quanzheng，TANG Cailu. Effect brassinolide on yield and quality of litchi at young fruit stage[J]. South China Fruits，1999，28(2)：35.

[19] 吴玉东，赵天义，宁清丽，罗旋，尹奇勋，陈军 . 0.01%芸薹素内酯喷施火龙果增产试验初报[J]. 广西植保，2017，30(1)：30-31.
WU Yudong，ZHAO Tianyi，NING Qingli，LUO Xuan，YIN Qixun，CHEN Jun. Preliminary report on increasing yield of pitaya by spraying 0.01% brassinolide[J]. Guangxi Plant Protection，2017，30(1)：30-31.

[20] 张钰娴 . 天然油菜素内酯和有机肥对苹果树生长发育及产量的影响[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2006.
ZHANG Yuxian. Effect of nbr and organic manure on yield and quality of Fuji apple tree[D]. Yangling: Northwest A & F University，2006.

[21] YIN Y，WANG Z Y，MORA-GARCIA S，LI J，YOSHIDA S，ASAMI T，CHORY J. *BES1* accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation[J]. Cell，2002，109(2): 181-191.

[22] JIANG J J，ZHANG C，WANG X L. A recently evolved isoform of the transcription factor BES1 promotes brassinosteroid signaling and development in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell，2015，27: 361-374.

[23] WANG Z Y，NAKANO T，GENDRON J，HE J，CHEN M，VAFEADOS D,YANG Y，FUJIOKA S，YOSHIDA S，ASAMI T，CHORY J. Nuclear-localized *BZR1* mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis[J]. Developmental Cell，2002，2(4): 505-513.