

黄瓜细胞分裂素合成关键酶 IPT 基因家族序列特征及其表达分析

张停林, 李季, 崔利, 苏芑, 徐建, 陈劲枫*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要: 为了分析黄瓜 IPT 家族基因, 以及黄瓜 IPT 基因 *CsIPT* 与果实发育的关系, 以黄瓜单性结实自交系 ‘EC1’ 和非单性结实自交系 ‘8419s-1’ 为试材, 应用荧光定量 PCR 技术, 在分析不同器官中 *CsIPT* 表达特征的基础上, 寻找果实发育中的作用基因, 进一步分析这些基因在果实发育过程中的表达特征。结果表明: 8 个黄瓜 IPT 基因 (*CsIPT1* ~ *CsIPT8*) 核苷酸相似性在 17.3% ~ 33.2% 范围内, 氨基酸长度在 280 ~ 504 AA 之间, 具有共同的 ATP/GTP 结合功能域 [(A,G)-X₄-G-K-(S,T)], *CsIPT4* 氨基酸序列中包含有一个锌指基序 (C-X₂-C-X_{12,18}-H-X₅-H) 类似序列; 黄瓜幼果中 *CsIPT3*、*CsIPT5*、*CsIPT7* 和 *CsIPT8* 表达水平较高; *CsIPT1*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT5* 的表达量在未发育的果实中有增加的趋势, *CsIPT2* 和 *CsIPT8* 在未发育的果实中表达基本无变化, 而在授粉后发育的果实中表达量很高, 说明这两个基因可能与授粉后黄瓜果实发育调控有关。此外, *CsIPT2* 在天然单性结实材料 ‘EC1’ 果实发育早期表达较高, 推测其在黄瓜单性结实果实发育中发挥着重要作用。

关键词: 黄瓜; 单性结实; IPT; 基因表达; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 01-0058-11

Identification and Characterization of *CsIPT* Genes in Cucumber

ZHANG Ting-lin, LI Ji, CUI Li, SU Peng, XU Jian, and CHEN Jin-feng*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To identify IPT family genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and investigate the relationship between cucumber fruit development and *CsIPT*, parthenocarpic line ‘EC1’ and non-parthenocarpic line ‘8419s-1’ were used for real-time RT-PCR analyses. Based on the expression patterns of *CsIPT* in different organs, functional genes involved in fruit development were identified and further analyzed by their expression patterns during fruit development. The results indicated that similarity of eight *CsIPT* genes were in the range of 17.3% - 33.2%, length of amino acids were 280 - 504 AA. *CsIPTs* had a common ATP/GTP binding domain of the [(A,G)-X₄-G-K-(S,T)]. *CsIPT4* contained putative a zinc finger-like motif (C-X₂-C-X_{12,18}-H-X₅-H). *CsIPT3*, *CsIPT5*, *CsIPT7* and *CsIPT8* had higher expression in the early cucumber fruit. In the undeveloped fruit *CsIPT1*, *CsIPT3*, *CsIPT4* and *CsIPT5*

收稿日期: 2012-08-29; **修回日期:** 2012-12-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ‘973’ 项目 (2012CB113904); 南京农业大学校基本科研业务费项目 (Y0201100253); 南京农业大学青年科技创新基金项目 (KJ2012013)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

showed an significant increasing trend. *CsIPT2* and *CsIPT8* were related to fruit development after pollination, at the same time the expression of *CsIPT2* was higher in the early fruit development of 'EC1'. Therefore, it was speculated that *CsIPT2* may participated in the regulation of fruit development in cucumber parthenocarpic line.

Key words: cucumber; *Cucumis sativus* L.; parthenocarpy; isopentenyl-transferases (IPT); gene expression; quantitative real-time RT-PCR

异戊烯基转移酶 (isopentenyl-transferases, IPT) 是催化细胞分裂素生物合成的关键酶, 也是重要的限速酶, 其编码基因最早在根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中得到鉴定, 命名为 *IPT* (Chen & Melitz, 1979; Blackwell & Horgan, 1994)。研究发现在拟南芥中有 9 个 IPT 基因家族成员, 被命名为 *AtIPT1* ~ *AtIPT9* (Takei et al., 2001)。

细胞分裂素在植物生长发育过程中发挥着重要的调控作用 (Gillaspy et al., 1993; Huang et al., 2003; Ozga & Reinecke, 2003)。外源细胞分裂素能够促进黄瓜、西瓜、梨和苹果的未授粉果实的发育, 从而产生无籽果实 (Um et al., 1995; Flaishman et al., 2001; Stern et al., 2003; Fu et al., 2010)。同时, 研究表明高水平的内源细胞分裂素也能够促进番茄的果实发育 (Srivastava & Handa, 2005)。

黄瓜果实发育存在不经过授粉受精而坐果的现象, 称之为单性结实 (Talon et al., 1992)。单性结实能够避免环境对坐果的影响从而稳定果实的产量和品质, 因此单性结实是保护地黄瓜专用品种选育的重要目标性状 (闫立英 等, 2009)。Takeno 等 (1992) 认为, 黄瓜果实发育中细胞分裂素可能发挥着最为重要的作用。

研究表明, 在番茄中利用果实特异性启动子大量表达 IPT 基因能得到稳定的单性结实株系 (Mao et al., 2002), 这为细胞分裂素调控植物的单性结实提供了直接证据。本研究中, 从黄瓜基因组数据库中发掘 IPT 基因, 首先弄清 *CsIPT* 家族成员在不同器官中的表达模式, 然后分析该家族基因在果实发育中的表达情况, 推测其在果实发育过程中的作用, 为其他作物的相关研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料及其 cDNA 合成

以本实验室选育的黄瓜单性结实自交系 'EC1' 和非单性结实自交系 '8419s-1' 为材料, 2011 年秋季定植在南京农业大学实验站。于开花前一天进行夹花处理, 'EC1' 在开花当天及未授粉处理 2、4、6 和 8 d 取果实样品, '8419s-1' 做未授粉和授粉处理, 分别于开花当天和花后 4 d 取果实样品。另取 '8419s-1' 的根、茎、叶和开花当天的雄花及幼果样品。每个取样点设 3 个生物学重复。取后立即放液氮速冻, 后贮存于 -70 °C 超低温冰箱待用。用总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取黄瓜果实中的总 RNA, 而后用 DNase I, RNase-free (fermentas) 消除 DNA 的污染, 利用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 合成 cDNA 第一链。

1.2 黄瓜 IPT 基因家族的检索、比对、进化树分析

根据拟南芥 *IPT* 基因序列 (*AtIPT1*: AB062607; *AtIPT2*: AB062609; *AtIPT3*: AB061401; *AtIPT4*: AB062611; *AtIPT5*: AB062608; *AtIPT6*: AB061404; *AtIPT7*: AB062613; *AtIPT8*: AB062614; *AtIPT9*: AB062615) 在黄瓜基因组数据库 (<http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp>) 中进行 Blast 检索, 再结合检索到的基因注释, 共得到 8 个 IPT 家族基因 (基因 ID 见表 1)。用 DNAMAN 7.0 (默认设置) 对黄瓜和拟南芥 IPT 家族基因进行同源性比对分析。使用 MEGA5.0 软件的邻接法

(neighbour-joining method) 构建系统进化树, 并利用 Bootstrapping (1 000 次) 对进化树进行评估。

1.3 黄瓜 IPT 基因家族特异引物的设计

对在黄瓜基因组数据库检索到的 8 个 IPT 家族基因利用软件 Primer Premier 6.0 设计特异引物, 并用软件 Oligo 6.0 评估调整引物, 委托英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成 (表 1)。

表 1 *CsIPT* 基因表达分析的引物序列及产物大小
Table 1 Primer sequences and product sizes by expression analysis of *CsIPT* genes

基因名称 Gene	基因 ID Gene ID	引物 Primer	产物大小/bp Product size
<i>CsIPT1</i>	<i>Csa000066</i>	5'-CGATTCCGATACGAGTTCTG-3' 5'-CAATTCTGGCACTCCGATAG-3'	183
<i>CsIPT2</i>	<i>Csa001021</i>	5'-GGTCTGGACATTACAATAACA-3' 5'-GGGAGTGAAATCTTGGTGAAT-3'	102
<i>CsIPT3</i>	<i>Csa004014</i>	5'-GCAGCCTTCATACTGTGTGT-3' 5'-AGAACCAGTTGGACCAGATAT-3'	179
<i>CsIPT4</i>	<i>Csa006964</i>	5'-GAAGGTGGTCGTGATTATGG-3' 5'-ATAGAGTCGGCGTTGATGAT-3'	102
<i>CsIPT5</i>	<i>Csa018435</i>	5'-AACGGTGTGAGTATCTTAGC-3' 5'-GAACTGAATCTGTCCGGAATTG-3'	141
<i>CsIPT6</i>	<i>Csa021143</i>	5'-CACATCACCTCCTTGAATC-3' 5'-GCAACAATCATAACGGTAACG-3'	194
<i>CsIPT7</i>	<i>Csa022290</i>	5'-TTCTGTGGGTCTAGGAATCG-3' 5'-TCCACCATCCCACCATCAA-3'	137
<i>CsIPT8</i>	<i>Csa025189</i>	5'-CTCCATCAACGAATTGAGCA-3' 5'-TGGCGCAAACACCTCGATAA-3'	196

1.4 黄瓜 IPT 家族基因的表达分析

以 *Actin* (DQ115883) 为内参基因, 正向引物为 5'-GGTGGTGAACATGTAACCTC-3', 反向引物为 5'-TTCTGGTGATGGTGTGAGTC-3', 按照 SYBR Premix Ex *Taq*TM 试剂盒 (购自宝生物工程有 限公司) 操作指导, 在 Bio-rad 公司的 My-IQ 2 荧光定量 PCR 仪上检测基因的表达量。总反应体系 为 20 μ L: 10 μ L SYBR premix Ex *Taq*TM (2 \times) 混合液, 1 μ L cDNA, 1 μ L 上游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 1 μ L 下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 7 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环, 在 60 $^{\circ}$ C 采集荧光。每个样品设 3 个技术重复。基因表达水平的计算参照 Livak 和 Schmittgen (2001) 的 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法。在不同器官中的表达水平计算以叶片中的表达量作为基准。在 果实中的表达水平计算以开花当天的子房表达量为 1 作为基准。

2 结果与分析

2.1 *CsIPT* 家族序列分析

在黄瓜基因组数据库中共检索到 8 个 IPT 基因, 分别命名为 *CsIPT1*、*CsIPT2*、*CsIPT3*、*CsIPT4*、*CsIPT5*、*CsIPT6*、*CsIPT7* 和 *CsIPT8*, 其中 *CsIPT1*、*CsIPT2*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT6* 可确认分 别位于 3、5、4、1、6 号染色体。通过 DNAMAN 7.0 分析黄瓜 *CsIPT* 家族成员间的核苷酸相似性 在 17.3%~33.2% 范围内。编码的氨基酸长度差异较大, 其中最短的 280 AA (amino acid residue, 氨 基酸残基) 是由 *CsIPT2* 所编码, 最长的 504 AA 是由 *CsIPT3* 所编码。

GenBank 比对发现基因 *CsIPT1* 的核苷酸与拟南芥、大豆 *IPT5* 同源性分别为 69% 和 64%; *CsIPT2* 的核苷酸与拟南芥、葡萄 *IPT1* 同源性分别为 69% 和 65%; *CsIPT3* 的核苷酸与拟南芥、大豆及葡萄 *IPT9* 同源性分别为 82%、78% 和 83%; *CsIPT4* 的核苷酸与拟南芥、大豆及葡萄 *IPT2* 同源性分别为

79%、74%和 79%; *CsIPT5* 的核苷酸与拟南芥、百脉根 *IPT3* 同源性分别为 66%、68%; *CsIPT6* 的核苷酸与拟南芥、葡萄 *IPT5* 同源性分别为 68%、66%; *CsIPT7* 的核苷酸与拟南芥 *IPT8* 同源性为 80%; *CsIPT8* 的核苷酸与拟南芥 *IPT9* 同源性为 31%。

AtIPT1	S S L L S F T K R R R K H Q P L V S S I R M E Q S R S R N R K D K V V V I L G A	73
AtIPT2 E K M K K K A K V V V I M G P	28
AtIPT3	S P T L D F P P A R F G P N M L T L N P Y G P K D K V V V I M G A	49
AtIPT4 M K C N D K M V V I M G A	13
AtIPT5	. L S L N F Q G N M V D V P F F R R K D K V V F V M G A	41
AtIPT6	T V T T K F G S P R L V T T C M G H A G R K N I K D K V V L I T G T	53
AtIPT7	. . I L C F K N K L S . . K V N V N S F L H P K E K V I F V M G A	42
AtIPT8	. . . L R L P P P R S V V P . . M T T V C M E Q S Y K Q K V V V I M G A	51
AtIPT9	S L V L R R R F C A . . A T T A C S V P L N G N K K K K S E K E K V I V I S G P	58
CsIPT1 M G A	3
CsIPT2 M G A	3
CsIPT3	S I S Y R R T R C R R L F A T F C S A A A I P N K E R K S . . . K V I V I S G P	77
CsIPT4 L N M G G E K P K V V V I M G P	30
CsIPT5 M K D N G V E Y L S N K K H K I V F V M G S	22
CsIPT6	. P L V N F Q G T N N . . T L N L E P F F R R K D K V V F V M G A	46
CsIPT7 R R P R C P L I L S S A P S D S L L L L L G A	37
CsIPT8	Q K L P L Y D A A C A G . . C V A H G A A G G W G E R A A S L P K A I F L M G P	67
Consensus	g	
AtIPT1	T G A G K S R L S V D L A T R . F P S E I I N S D K I Q	100
AtIPT2	T G S G K S K L A V D L A S H . F P V E I I N A D A M Q	55
AtIPT3	T G T G K S R L S V D I A T R . F R A E I I N S D K I Q	76
AtIPT4	T G S G K S S L S V D L A L H . F K A E I I N S D K M Q	40
AtIPT5	T G T G K S R L A I D L A T R . F P A E I V N S D K I Q	68
AtIPT6	T G T G K S R L S V D L A T R F F P A E I I N S D K M Q	81
AtIPT7	T G S G K S R L A I D L A T R . F Q G E I I N S D K I Q	69
AtIPT8	T G S G K S C L S I D L A T R . F S G E I V N S D K I Q	78
AtIPT9	T G A G K S R L A M E L A K R . I N G E I I S A D S V Q	85
CsIPT1	T G T G K S R L A I E L A T R . F P S E I V N S D K I Q	30
CsIPT2	T G C G K S G L S V Q L A S H . Y Q S E I I N C D K M Q	30
CsIPT3	T G S G K S R L A M E L A K R . I N G E I I S A D S V Q K I N G I E G W K L M W	116
CsIPT4	T G S G K S R L A I D L A S Y . F P V E I I N A D S M Q	57
CsIPT5	T A T G K S K L S V D L A T F . F P S E I I N S D K I Q	49
CsIPT6	T G T G K S R L A I D L A T R . F P A E I I N S D K I Q	73
CsIPT7	T G S G K S S L S I D L A A R . F P S E I I N S D K M Q	64
CsIPT8	T A S G K T A L A I E L R K V . I P V E L I S V D S A L	94
Consensus	t g k l e d	
AtIPT1	357
AtIPT2	R D L W T Q Y V C E A C G N K I L R G R H E W E H H K Q G R T H R K R T T R H K	450
AtIPT3	P L V E A S T A V A A A M E R E L S R C L V A	336
AtIPT4	R F L S L N	318
AtIPT5	P E I S A V P P L P A A V A . A I S R	330
AtIPT6	342
AtIPT7	D D V E H C L A A S Y G G G . S G S R A H N M I	329
AtIPT8	330
AtIPT9	S E A S C V E S A I A	463
CsIPT1	T G I S T P D A V S R A V A . A V S R	283
CsIPT2	280
CsIPT3	T Q S V Y Q D F P V A	504
CsIPT4	K D L W T Q Y I C Q A C G N K V L R G A H E W E Q H N Q G R T H R K R M Y R L R	430
CsIPT5	R S M G V M D E Y E E L K A K W N F G S N N A I G F G L V I V F T S L G L M T N	333
CsIPT6	N S F K L T E K V F S A V F	326
CsIPT7	320
CsIPT8	Q A L N E V I E V I G D I A D	365
Consensus		

图 1 IPT 蛋白的功能域比对

Fig. 1 Multiple alignment analyzing the binding domain of IPT proteins

利用 DNAMAN 7.0 分析黄瓜和拟南芥 IPT 家族基因编码的 IPT 蛋白, 发现黄瓜和拟南芥的 IPT 蛋白序列相似度不是很高, 但都具有高度保守的功能区段[(A, G)-X₄-G-K-(S, T)]。CsIPT4 和 AtIPT2 氨基酸序列中都包含有一个锌指基序 (C-X₂-C-X_{12,18}-H-X₅-H) 类似序列 (图 1)。

2.2 CsIPT 家族进化树分析

集合 8 个黄瓜 CsIPT 和 9 个拟南芥 AtIPT 及 X62428(带化红球菌, *Rhodococcus fascians*), Z46375 (草生欧文氏菌, *Erwinina herbicola*), X17428 和 AB025109 (根瘤土壤杆菌, *Agrobacterium tumefaciens*) 4 个细菌的 IPT 蛋白序列用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。发现这些 IPT 蛋白主要分为两大类 (图 2), 细菌和植物明显分开, 黄瓜和拟南芥的 IPT 蛋白都在第一类, 4 种细菌的 IPT 蛋白组成第二类。第一类又可分为两类: CsIPT1、CsIPT6、CsIPT5、CsIPT7、CsIPT2、CsIPT4 与 AtIPT1、AtIPT2、AtIPT3、AtIPT4、AtIPT5、AtIPT6、AtIPT7、AtIPT8 聚为一类, 其中 CsIPT4 与 AtIPT2 (真核生物 tRNA-IPT) 距离最近。CsIPT8、CsIPT3 与 AtIPT9 (原核生物 tRNA-IPT) 聚为一类。

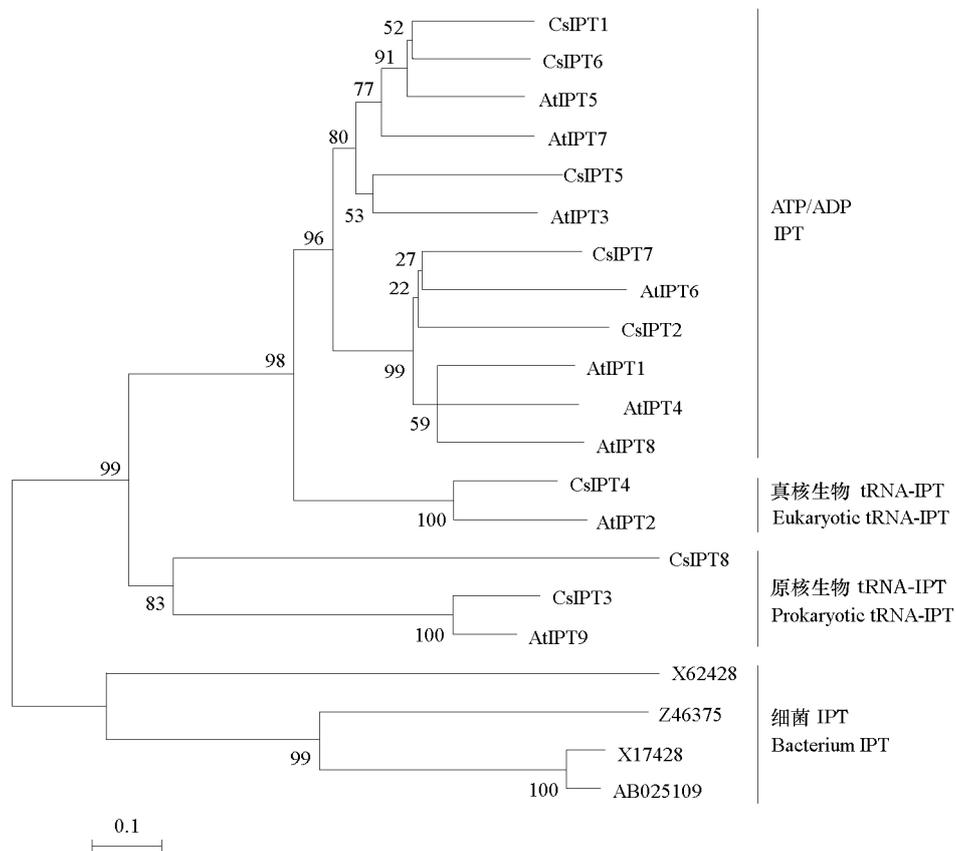


图 2 黄瓜及其他物种 IPT 氨基酸序列的进化树分析

Cs: 黄瓜; At: 拟南芥; X62428: 带化红球菌; Z46375: 草生欧文氏菌; X17428 和 AB025109: 根瘤土壤杆菌。

Fig. 2 The phylogenetic tree of IPT proteins in cucumber and other species

Cs: *Cucumis sativus*; At: *Arabidopsis thaliana*; X62428: *Rhodococcus fascians*; Z46375: *Erwinina herbicola*; X17428 and AB025109: *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3 CsIPT 在非单性结实黄瓜不同器官中的表达特征分析

非单性结实黄瓜 ‘8419s-1’ 根、茎、叶、幼果和雄花 5 种器官中 IPT 家族基因的表达情况如图

3 所示。基因 *CsIPT1*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT5* 都是在雄花中表达量最高。*CsIPT2* 在叶中表达量最高, 在其他 4 种器官表达量差异不大。基因 *CsIPT6* 在根、茎和雄花中表达量相对较高, 其中在根中表达量最高, 且与其他器官的表达相差较大。*CsIPT8* 在茎中有最高的表达, 在根中表达量最低。*CsIPT3*、*CsIPT5*、*CsIPT7* 和 *CsIPT8* 在黄瓜幼果中都有较高表达量, 可能在幼果发育中发挥着一定的作用。

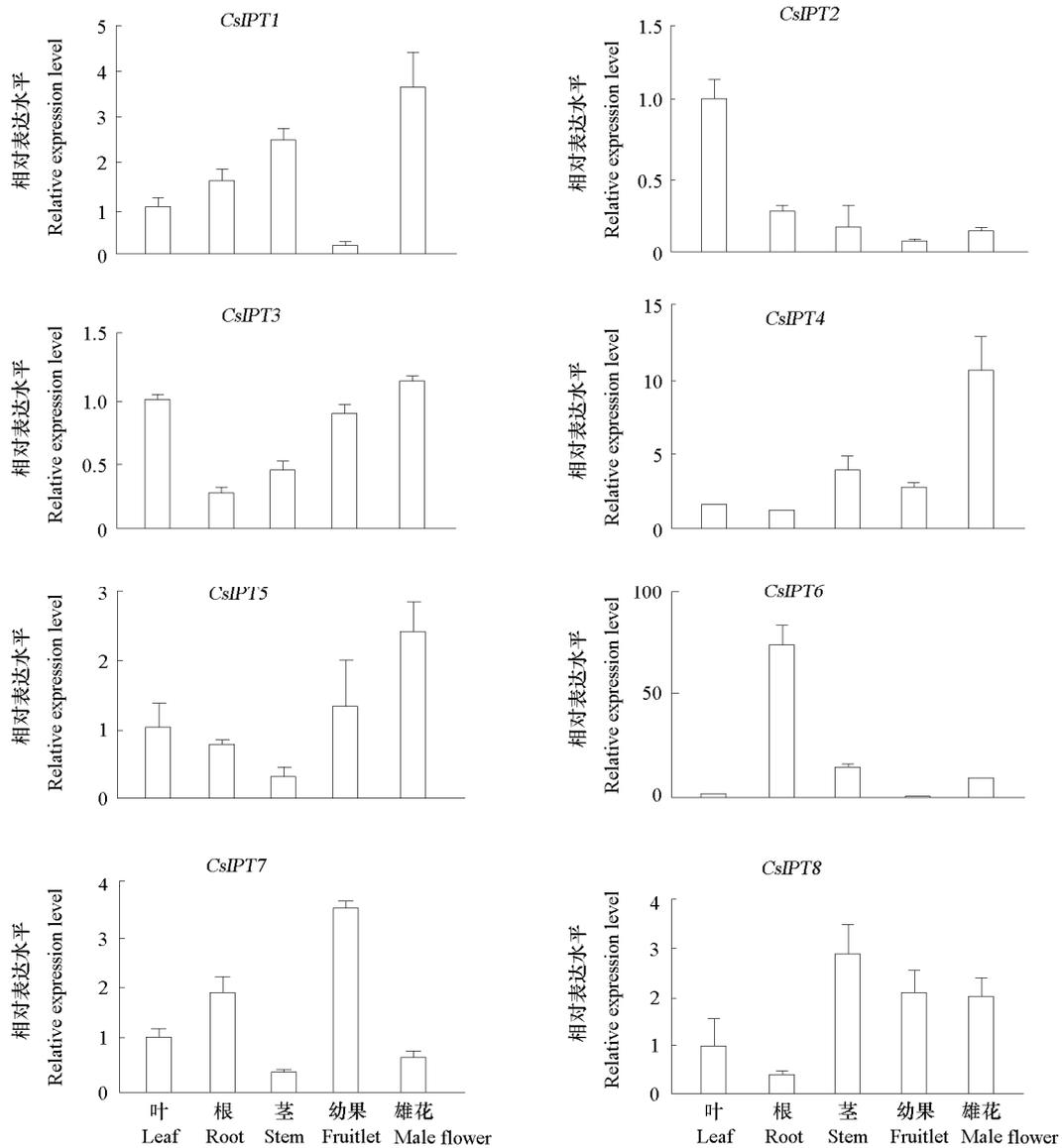


图 3 *CsIPT* 在非单性结实黄瓜不同器官中的表达

Fig. 3 Expression analysis of *CsIPT* in the different organs of non-parthenocarpic line

2.4 *CsIPT* 在单性结实和非单性结实黄瓜中的相对表达水平

采用单性结实材料‘EC1’和非单性结实材料‘8419s-1’开花当天的子房材料, 以‘8419s-1’

的表达量为基准, ‘EC1’ 相对表达量的 log 值作图。由图 4 可知, 基因 *CsIPT2*、*CsIPT3* 和 *CsIPT7* 表达量的 log 值大于 0, 说明在开花当天 ‘EC1’ 中这 3 个基因的表达水平高于 ‘8419s-1’。基因 *CsIPT1*、*CsIPT4*、*CsIPT5*、*CsIPT6* 和 *CsIPT8* 表达量的 log 值小于 0, 说明在开花当天 ‘8419s-1’ 中这些基因的表达水平高于 ‘EC1’。

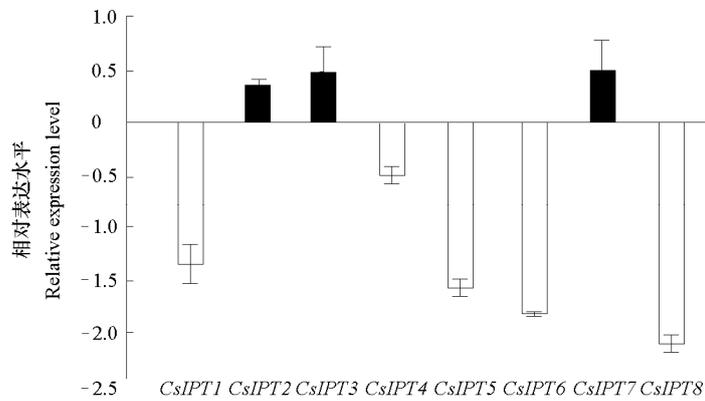


图 4 以非单性结实黄瓜 ‘8419s-1’ *CsIPT* 表达量为基准在单性结实黄瓜 ‘EC1’ 中的相对表达水平

Fig. 4 Expression of *CsIPT* in parthenocarpic line ‘EC1’ contrast with non-parthenocarpic line ‘8419s-1’

2.5 *CsIPT* 在黄瓜果实发育中的表达

从图 5 可以看出, 黄瓜非单性结实材料 ‘8419s-1’ 授粉后 4 d, 子房中 *CsIPT1* 和 *CsIPT3* 表达量轻微上调 (差异不显著), 未授粉处理上调表达较大; *CsIPT4* 和 *CsIPT5* 授粉后表达量下降, 未授粉处理表达量升高, 推测基因 *CsIPT1*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT5* 可能参与了黄瓜果实衰老的调控过程。*CsIPT6* 和 *CsIPT7* 授粉后表达量降低, 且低于同时期未授粉的表达量, 授粉可能抑制了基因 *CsIPT6* 和 *CsIPT7* 的表达。*CsIPT2* 和 *CsIPT8* 未授粉处理表达量变化不大, 授粉后的子房基因 *CsIPT2* 和 *CsIPT8* 的表达量上调, 二者可能对授粉后的黄瓜果实发育有促进作用。

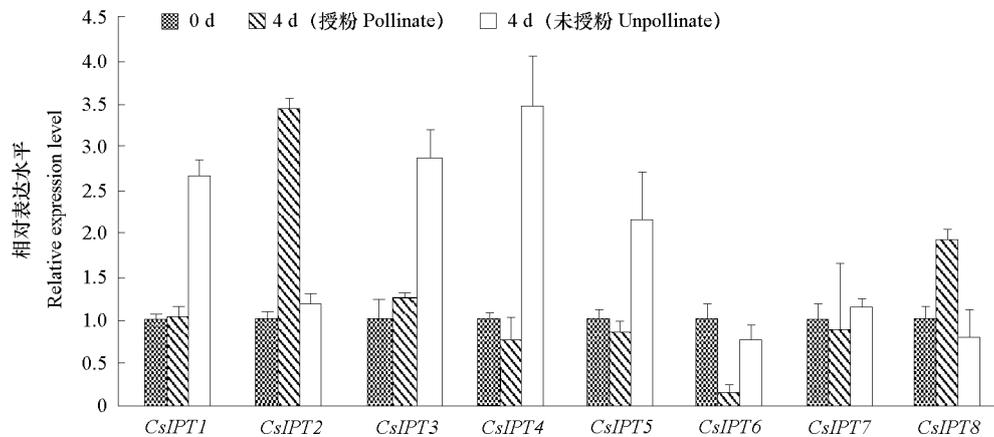


图 5 *CsIPT* 在非单性结实黄瓜 ‘8419s-1’ 果实发育过程中的表达

Fig. 5 Expression of *CsIPT* during the fruit development of non-parthenocarpic line ‘8419s-1’

在黄瓜单性结实材料 ‘EC1’ 中 (图 6), *CsIPT1*、*CsIPT4* 和 *CsIPT8* 在开花当天子房中表达量最高, 随后降低, 并趋于平稳。*CsIPT2* 在花后表达量大量上调, 2 d 达到峰值, 而后降低, 随后又有一个表达量上升的过程, 推测 *CsIPT2* 在单性结实现果发育中发挥着一定的作用。*CsIPT3* 和 *CsIPT5* 的表达量在花后 2 d 降低, 花后 4 d 有个回升的过程, 然后在 6 d 又降低, 到 8 d 趋于平缓。*CsIPT6* 在花后表达量降低, 4 d 达到最低值, 而后表达量上升。*CsIPT7* 在开花当天到花后 4 d 表达量基本无变化, 花后 6 d 表达量下降, 到 8 d 趋于平缓。

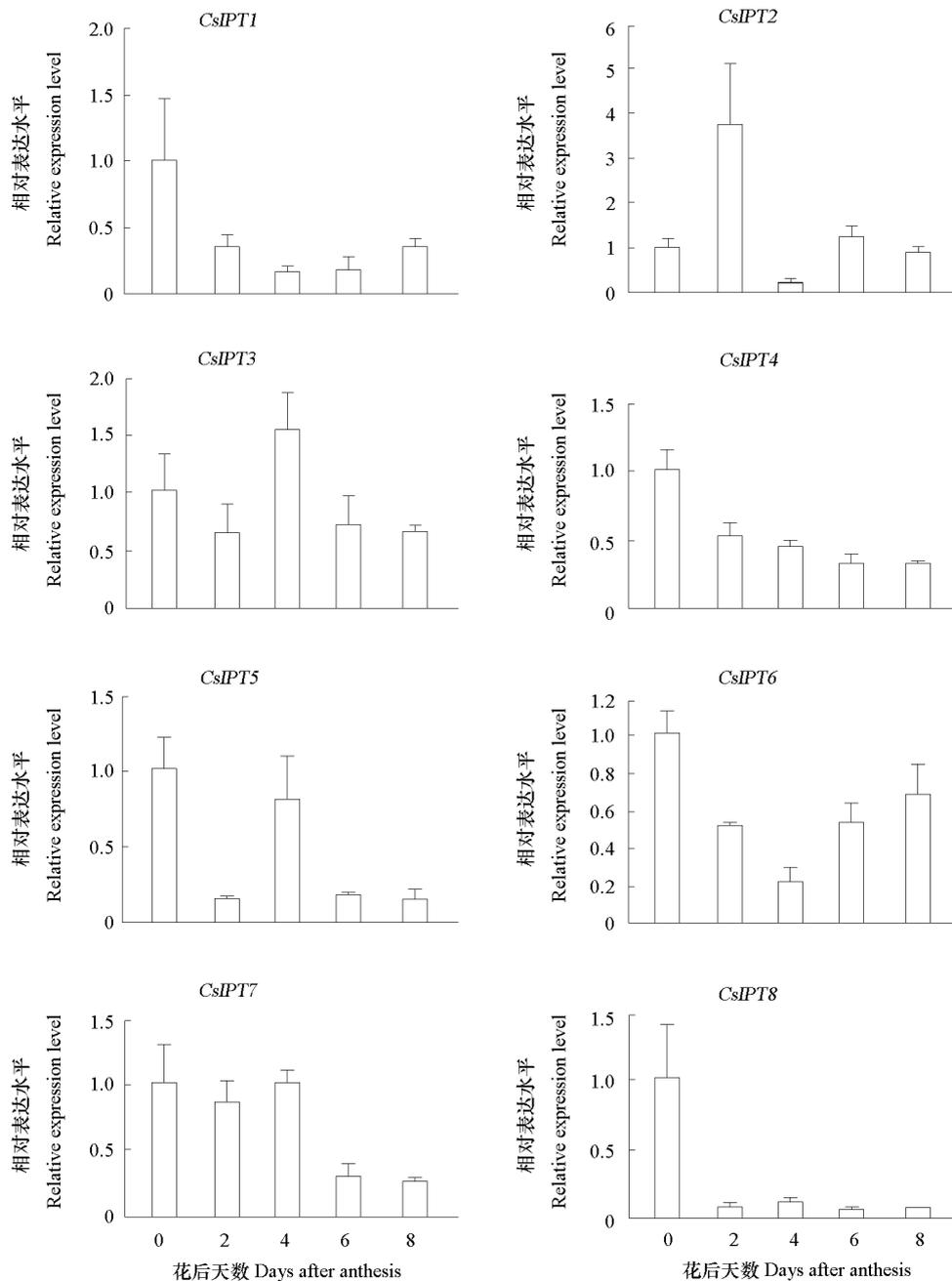


图 6 *CsIPT* 在单性结实黄瓜 ‘EC1’ 果实发育过程中的表达

Fig. 6 Expression of *CsIPT* during the fruit development of parthenocarpic line ‘EC1’

3 讨论

IPT 家族基因已被证实能够诱导番茄单性结实 (Mao et al., 2002), 目前黄瓜中只有 *CsIPT1* 基因得到了分离, 但其基因的具体功能尚未分析鉴定 (张微微等, 2010)。黄瓜基因组测序的完成及数据库的建立 (Huang et al., 2009) 为深入研究黄瓜单性结实的分子机理提供了条件。

IPT 家族是一个小的多基因家族, 本研究中利用生物信息学方法从黄瓜基因组数据库中发现黄瓜至少存在 8 个家族成员, 成员之间序列差异较大, 核苷酸相似性在 17.3%~33.2% 范围内, 在进化过程中可能通过序列重复、缺失等发生了分化。虽然成员之间序列差异较大, 但是它们与拟南芥、大豆和葡萄等同源性较高。其编码的氨基酸长度在 280~504 AA 之间, 且都具有共同的保守功能区段 [(A, G)-X₄-G-K-(S, T)] (ATP/GTP 和 DMAPP 结合域), 能够结合细胞分裂素的合成底物, 具有催化形成细胞分裂素的能力 (Takei et al., 2001)。

IPTs 分 ATP/ADP *IPTs* 和 tRNA-*IPTs* 两类: 前者负责异戊烯腺嘌呤和反式玉米素类型的细胞分裂素的合成, 后者催化形成顺式型的细胞分裂素 (Kaori et al., 2006)。Takei 等 (2001) 推测这两类 *IPT* 可能从共同的祖先细菌 *IPT* 基因分化而来。图 2 所示细菌和植物分为两大类也证明了这一点。*CsIPT4* 和 *AtIPT2* 氨基酸序列中都包含有一个锌指基序 (C-X₂-C-X_{12,18}-H-X₅-H) (图 1) 类似序列, 该基序在保持真核生物 tRNA-*IPT* 酶活性中具有重要的作用 (Takei et al., 2001)。推测 *CsIPT4* 是黄瓜中的真核生物 tRNA-*IPT* 基因。有研究认为没有此基序的 *AtIPT9* 是植物中的原核生物 tRNA-*IPT* 酶 (Yevdakova & Schwartzenberg, 2007)。*CsIPT3*、*CsIPT8* 与其有较高的同源性, 二者的编码基因可能是黄瓜中的原核生物 tRNA-*IPT* 基因。黄瓜中 *IPT* 酶的具体分类及其相关代谢产物可参照拟南芥利用生化分析手段进一步研究确定 (Takei et al., 2001; Sakakibara & Takei, 2002; Kaori et al., 2006)。

CsIPT 家族基因的表达具有特异性。基因 *CsIPT6* 在根中大量表达。研究认为, 根是细胞分裂素生物合成的主要部位, 根部合成的细胞分裂素不仅能够调控自身的分化, 还能输送到植物其他部位影响其生长发育 (Werner et al., 2003; Hirose et al., 2008)。推测在黄瓜根部主要是由基因 *CsIPT6* 调控细胞分裂素的生物合成。在番茄中果实生长所需的水分和营养等物质要通过输导组织运输到果实 (Ho et al., 1987), 而细胞分裂素作为形成层的主要调控因子, 能够通过细胞分裂调控输导组织的分化 (Matsumoto-Kitano et al., 2008)。同时细胞分裂素在调控叶的形态建成中也发挥着重要的作用 (Shani et al., 2010)。黄瓜中 *CsIPT2*、*CsIPT8* 分别在叶和茎中表达量最高, 二者可能在叶和茎局部细胞分裂素的合成中起着重要的作用。在玉米正常植株中过量表达 *CKX1* 基因 (细胞分裂素氧化/脱氢酶基因), 能够导致玉米雄性不育 (Huang et al., 2003)。推测在黄瓜雄花中基因 *CsIPT1*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT5* 的高表达保证了雄花的正常生长发育。黄瓜开花当天的子房中基因 *CsIPT3*、*CsIPT5*、*CsIPT7* 和 *CsIPT8* 表达量较高, 这些基因可能参与了黄瓜幼果的发育。

研究认为 *IPT* 基因能够延缓莴苣、玉米的衰老 (McCabe et al., 2001; Robson et al., 2004)。在黄瓜不能正常发育的果实中, 基因 *CsIPT1*、*CsIPT3*、*CsIPT4* 和 *CsIPT5* 表达量明显升高 (图 5), 这 4 个基因可能参与了果实衰老的调控。*CsIPT2* 的表达量在 ‘8419s-1’ 授粉处理后 (图 5) 及 ‘EC1’ 单性结实的果实发育中都有明显升高 (图 6), 并且在开花当天 ‘EC1’ 中表达水平高于 ‘8419s-1’ (图 4), 推测 *CsIPT2* 不仅参与了黄瓜授粉后的果实发育, 而且在单性结实的调控中可能发挥着重要作用。在黄瓜发育的果实中未检测到 *CsIPT7* 的表达量上调 (图 5, 图 6), *CsIPT7* 可能在果实发育中无明显的作用。在 ‘8419s-1’ 中授粉上调了 *CsIPT8* 的表达 (图 5), 而在 ‘EC1’ 单性结实的果实中表达量下降 (图 6), 推测 *CsIPT8* 对授粉后的黄瓜果实发育有促进作用而与单性结实无关。

接下来计划对 *CsIPT2* 进行基因功能验证, 明确其在果实发育过程中的功能, 为其他作物的相关研究提供参考。

References

- Blackwell J R, Horgan R. 1994. Cytokinin biosynthesis by extracts of *Zea mays*. *Phytochemistry*, 35 (2): 339 - 342.
- Chen C, Melitz D K. 1979. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS Letters*, 107 (1): 15 - 20.
- Flaishman M A, Shargal A, Stern R A. 2001. The synthetic cytokinin CPPU increases fruit size and yield of 'Spadona' and 'Costia' pear (*Pyrus communis* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76: 145 - 149.
- Fu F Q, Mao W H, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. 2010. Spatio-temporal changes in cell division, endoreduplication and expression of cell cycle-related genes in pollinated and plant growth substances-treated ovaries of cucumber. *Plant Biology*, 12: 98 - 107.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell*, 5 (10): 1439 - 1451.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59: 75 - 83.
- Ho L C, Grange R I, Picken A J. 1987. An analysis of the accumulation of water and dry-matter in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment*, 10: 157 - 162.
- Huang S, Cerny R E, Qi Y, Bhat D, Ayt C M, Hanson D D, Malloy K P, Ness L A. 2003. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology*, 131: 1270 - 1282.
- Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, Li L, Gu X F, Fan W, Lucas W J, Wang X W, Xie B Y, Ni P X, Ren Y Y, Zhu H M, Li J, Lin K, Jin W W, Fei Z J, Li G G, Staub J, Kilian A, van der Vossen Edwin A G, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z Q, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W B, Wang M W, Huang Q F, Li B, Xuan Z L, Cao J J, Asan, Wu Z G, Zhang J B, Cai Q L, Bai Y Q, Zhao B W, Han Y H, Li Y, Li X F, Wang S H, Shi Q X, Liu S Q, Cho W K, Kim J Y, Xu Y, Heller-Uszynska K, Miao H, Cheng Z C, Zhang S P, Wu J, Yang Y H, Kang H X, Li M, Liang H Q, Ren X L, Shi Z B, Wen M, Jian M, Yang H L, Zhang G J, Yang Z T, Chen R, Liu S F, Li J W, Ma L J, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X D, Li G Q, Fang L, Li Y R, Liu D Y, Zheng H K, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G H, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B X, Jiang S Z, Wang J, Du Y C, Li S G. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41: 1275 - 1281.
- Kaori M, Petr T, Miho M K, Tomohiko K, Shusei S, Danuse T, Satoshi T, Goran S, Tatsuo K. 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 16598 - 16603.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 420 - 408.
- Mao Z C, Yu Q J, Zhen W, Guo J, Hu Y L, Gao Y, Lin Z P. 2002. Expression of *ipt* gene driven by tomato fruit specific promoter and its effects on fruit development of tomato. *Chinese Science Bulletin*, 47 (11): 928 - 933.
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T. 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 20027 - 20031.
- McCabe M S, Garratt L C, Schepers F, Jordi W, Stoopen G M, Davelaar E, Rhijn J H, Power J B, Davey M R. 2001. Effects of *PSAG12-IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127: 505 - 516.
- Ozga J A, Reinecke D M. 2003. Hormonal interaction in fruit development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 73 - 81.
- Robson P R H, Donnison I S, Wang K, Frame B, Pegg S E, Thomas A, Thomas H. 2004. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 101 - 112.
- Sakakibara H, Takei K. 2002. Identification of cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis*: A breakthrough for understanding the metabolic pathway and the regulation in higher plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (1): 17 - 23.
- Shani E, Ben-Gera H, Shleizer-Burko S, Burko Y, Weiss D, Ori N. 2010. Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *The Plant Cell*, 22: 3206 - 3217.

- Srivastava A, Handa A K. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 67 - 82.
- Stern R A, Ben-Arie R, Neria O, Flaishman M. 2003. CPPU and BA increase fruit size of 'Royal Gala' (*Malus domestica*) apple in a warm climate. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78: 297 - 302.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Biological Chemistry*, 276 (28): 26405 - 26410.
- Takeo K, Ise H, Minowa H, Dounowaki H, Dounowaki T. 1992. Fruit growth induced by benzyladenine in *Cucumis sativus* L.: Influence of benzyladenine on cell division, cell enlargement and indole-3-acetic acid content. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 60: 915 - 920.
- Talon M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology*, 99 (4): 1575 - 1581.
- Um Y C, Lee J H, Kang K H, Kang K Y, Son T H. 1995. Effects of forchlorfenuron application on the induction of parthenocarpic fruit and fruit quality in watermelon (*Citrullus vulgaris* S.) under greenhouse conditions. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 36 (3): 293 - 298.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, van Onckelen H, Schmillig T. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15: 2532 - 2550.
- Yan Li-ying, Lou Li-na, Li Xiao-li, Feng Zhi-hong, Lou Qun-feng, Chen Jin-feng. 2009. Evaluation of parthenocarpic in cucumber germplasm. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (7): 975 - 982. (in Chinese)
- 闫立英, 娄丽娜, 李晓丽, 冯志红, 娄群峰, 陈劲枫. 2009. 黄瓜种质资源单性结实性评价. *园艺学报*, 36 (7): 975 - 982.
- Yevdakova N A, Schwartzberg V K. 2007. Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 226: 683 - 695.
- Zhang Wei-wei, Pan Jun-song, Liu Chun-zhong, He Huan-le, Cai Run. 2010. Cloning and sequence analysis of isopentenyltransferase gene in cucumber. *Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agriculture Science*, 28 (6): 487 - 491. (in Chinese)
- 张微微, 潘俊松, 刘淳中, 何欢乐, 蔡润. 2010. 黄瓜异戊烯基转移酶基因的克隆及序列分析. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 28(6): 487 - 491.

征 订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,被英国《CAB文摘数据库》、美国CA化学文摘、日本CBST科学技术文献速报、俄罗斯AJ文摘杂志、CSCD中国科学引文数据库等多家重要数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及“中国精品科技期刊”、“中国权威学术期刊”、“新中国60年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”等称号。

根据“中国学术期刊影响因子年报(2011版)”,《园艺学报》复合总被引频次为11 630,期刊综合总被引频次5 317,复合影响因子1.780,期刊综合影响因子1.124。

《园艺学报》为月刊,每月25日出版。每期定价40元,全年480元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码:100081;电话:(010)82109523。E-mail:yuanyixuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。