

张停林 崔利 李季 等. 黄瓜异戊烯基转移酶基因(*CsIPT2*)的克隆及特征分析[J]. 南京农业大学学报 2014 37(1):21-26

黄瓜异戊烯基转移酶基因(*CsIPT2*)的克隆及特征分析

张停林 崔利 李季 郭勤卫 娄群峰 徐建 陈劲枫*

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

摘要: 为了分析黄瓜异戊烯基转移酶基因(*CsIPT2*) 在果实发育不同模式中的转录变化以及对不同激素的转录应答情况,对 *CsIPT2* 基因进行了克隆和序列分析,再利用荧光定量 PCR 技术分析该基因在黄瓜单性结实自交系 EC1 和非单性结实自交系 8419s-1 果实发育过程中的表达情况,并分析了 *CsIPT2* 对不同激素的应答反应。结果表明:*CsIPT2* 基因全长 843 bp,共编码 280 个氨基酸,蛋白空间结构模型与蛇麻 IPT 蛋白极其相似。该基因不仅在授粉后的黄瓜果实发育中表达量上调,而且在黄瓜天然单性结实前期和人工诱导的单性结实后期表达量均有增加,推测该基因在促进黄瓜果实发育过程中发挥着重要作用,同时也可能参与了黄瓜单性结实的调控过程。GA、ET、6-BA、ABA 和 NAA 5 种激素都能够诱导该基因的上调表达。其中 GA 处理后 3 h 基因表达量最高,ET、6-BA、ABA 和 NAA 诱导的表达峰值出现在处理后 6 h。随着 NAA 处理浓度的增加基因的表达量上调幅度增大。

关键词: 黄瓜; 黄瓜异戊烯基转移酶基因(*CsIPT2*); 克隆; 表达分析

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2014)01-0021-06

Isolation and characterization of isopentenyl transferase gene in *Cucumis sativus*(*CsIPT2*)

ZHANG Tinglin, CUI Li, LI Ji, GUO Qinwei, LOU Qunfeng, XU Jian, CHEN Jinfeng*

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

Abstract: To analyze the role of isopentenyl transferase gene in *Cucumis sativus*(*CsIPT2*) during fruit development of cucumber and response after different hormones treatment, based on cloning and sequence analysis of *CsIPT2* gene, parthenocarpic line EC1 and non-parthenocarpic line 8419s-1 were used for real-time RT-PCR analysis. The results showed that the length of *CsIPT2* gene was 843 bp, encoding 280 amino acids. The protein structure model was extremely similar to IPT protein of hop (*Humulus lupulus* L.). The expression of gene was higher during the fruit development of cucumber after pollination. At the same time the expression of *CsIPT2* was higher at the early stage of natural parthenocarpic fruit and the late stage of artificially induced parthenocarpic fruit. Therefore, it was speculated that *CsIPT2* might play an important role in promoting parthenocarpy of cucumber. Moreover, the five hormones (GA, ET, 6-BA, ABA and NAA) were able to up-regulate the expression of the gene. The highest expression of ET, 6-BA, ABA and NAA appeared 6 h after treatment, while only GA did 3 h after treatment. The higher the concentration the higher the expression during the NAA treatment.

Key words: cucumber; isopentenyl transferase gene in *Cucumis sativus*(*CsIPT2*); clone; expression analysis

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 是重要的蔬菜作物之一。黄瓜基因组测序的完成及数据库的公布^[1], 为从基因角度全面深入研究黄瓜的分子机制提供了便利, 在未来的研究中功能基因组学将成为焦点^[2]。细胞分裂素作为植物生长发育过程中重要的植物生长调节剂之一, 能够调控植物的果实发育, 诱导植物产生无籽果实^[3]。另外, 细胞分裂素在促进细胞分裂、顶端优势、器官分化、调节植物叶片衰老进程和某些重要的生理生化反应等方面均发挥着重要的作用^[4-5]。异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, IPT) 是催化细胞分裂素生物合成的关键酶, 也是最重要的限速酶。

1979年, Chen等^[6]从烟草的非肿瘤细胞中分离出具有IPT活性的片段。随后Akiyoshi等^[7]从根癌农杆菌中将编码此酶的基因分离出来, 命名为*tmr*, 后来称为*IPT*, 该酶是细胞分裂素合成步骤中的一个关键

收稿日期: 2013-01-11

基金项目: 国家973计划项目(2012CB113904, 2009CB119001-01); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20120097120037); 江苏省农业科技支撑计划重大项目(BE2012323)

作者简介: 张停林, 硕士研究生。*通信作者: 陈劲枫, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

限速酶。1994年,Blackwell等^[8]又从玉米中纯化得到了该酶。IPT分为ATP/ADP IPTs和tRNA-IPTs两类,前者催化形成异戊烯腺嘌呤和反式玉米素类型的细胞分裂素,后者主要作用于顺式型的细胞分裂素的合成^[9]。研究表明,IPT基因不仅能够延缓叶片衰老,提高植物的抗性^[10],而且通过将果实特异性启动子与IPT基因构建的载体转入到番茄中,能够得到稳定的单性结实株系^[11],这为细胞分裂素调控单性结实提供了直接证据。

近几年来,IPT基因已经在玉米^[12]、水稻^[13]、大豆^[14]、白菜^[15]等植物中克隆得到。2010年,张微微等^[16]在黄瓜中也克隆到1个IPT基因。笔者前期在黄瓜基因组数据库中找到8个IPT基因,通过初步分析发现1个与果实发育关系密切,命名为*CsIPT2*基因(未发表)。本研究对*CsIPT2*基因进行分离,获得该基因的全长cDNA序列,并阐述该基因与其编码蛋白质的结构特征,研究其在果实发育过程中的表达特征及对不同激素的应答情况,为进一步深入研究IPT基因的功能及果实发育的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄瓜品种为本实验室选育的单性结实自交系EC1和非单性结实自交系8419s-1,于2012年种植在南京农业大学江浦园艺学院实验基地和实验室人工气候箱。使用8419s-1进行*CsIPT2*基因的克隆、序列分析及不同激素处理下*CsIPT2*的应答。利用EC1和8419s-1两种材料研究黄瓜不同果实发育模式的表达情况。

1.2 植物培养及取样

黄瓜种子浸种催芽后定植于江浦园艺实验基地,部分8419s-1在人工气候箱中培养。实验基地的黄瓜材料于开花前一天进行套袋处理,EC1和8419s-1分别进行未授粉和授粉处理,8419s-1另进行100 mg·L⁻¹的氯吡苯脲(Forchlorfenuron, CPPU)处理。分别于花后0、2、4、6和8 d取果实样品,其中8419s-1未授粉处理8 d子房已经脱落,只取花后0、2、4和6 d果实样品。取后立即用液氮速冻,贮存于-70℃超低温冰箱待用。人工气候箱中的8419s-1于2叶1心期选取生长健壮一致的幼苗分别用10 μmol·L⁻¹赤霉素(GA),15 μmol·L⁻¹乙烯(ET),10 μmol·L⁻¹6-苄氨基嘌呤(6-BA),1 μmol·L⁻¹脱落酸(ABA),5、10和50 μmol·L⁻¹萘乙酸(NAA)处理。于处理后3、6和9 h取嫩叶,同时取未处理的嫩叶,立即用液氮速冻,后贮存于-70℃超低温冰箱待用。每个取样点设3个重复。

1.3 DNA、RNA的提取及cDNA第1链的合成

采用改良CTAB法提取黄瓜嫩叶DNA,然后用10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测。用总RNA提取试剂盒(DP419,天根生化科技有限公司)提取各样品的总RNA。利用DNase I和RNase-free(EN0521,fermentas公司)去除DNA的污染后用10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测。cDNA第1链合成用PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(D6110A, TaKaRa),具体操作依照产品说明书进行。

1.4 引物设计与合成

以黄瓜基因组数据库中*Csa001021*基因编码区序列为模板,利用Primer Premier 6.0软件设计引物。基因克隆引物:正向引物为5'-TAAACATTCCATTTCTCGCC-3',反向引物为5'-CTACTCCTTCAAGAAT-CG-GT-3';qRT-PCR检测引物:正向引物为5'-GGTCTGGACATTACAACACTAACA-3',反向引物为5'-GGGAGT-GAAATCTTGGTGAAT-3'。选*actin*作为内参基因^[2]:正向引物为5'-GGTGGTGAACATGTAACCTC-3',反向引物为5'-TTCTGGTGATGGTGTGAGTC-3'。3对引物均委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.5 黄瓜*CsIPT2*基因克隆与序列分析

以叶片cDNA和gDNA为模板进行*CsIPT2*基因的分离,PCR反应体系总体积为20 μL:10×PCR Buffer 2.0 μL,dNTP 2.0 μL,MgCl₂ 1.2 μL,模板 1.0 μL,10 mmol·L⁻¹正、反向引物各1.0 μL,Taq聚合酶0.25 μL,ddH₂O 11.55 μL。用Biometra梯度PCR仪进行PCR扩增,反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 60 s,35个循环;72℃ 7 min。用10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测,利用DNA纯化/回收试剂盒(NEP013-2,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)回收目的条带,与pMD19-T载体(D102A, TaKaRa)16℃连接过夜。连接产物转化到大肠杆菌JM109感受态细胞中,经Amp抗性筛选和菌落PCR筛选,取阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

蛋白质理化性质采用ProtParam(www.expasy.ch/tools/protparam.html)进行在线分析。利用I-TASSER

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 对 *CsIPT2* 进行蛋白空间结构预测。蛋白信号肽的预测应用 SigalP(http://bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html) 在线软件进行。使用 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 进行蛋白的亚细胞定位预测。利用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线工具对启动子元件进行分析。

1.6 黄瓜 *CsIPT2* 基因的表达分析

分别提取黄瓜子房和叶片的总 RNA, 反转录为 cDNA。按照 SYBR *Premix Ex Taq*TM (TaKaRa) 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 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 在 60 $^{\circ}$ C 采集荧光。每个样品 3 个重复。基因表达水平的计算参照 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法^[17]。

2 结果与分析

2.1 DNA 和 RNA 的提取

提取的黄瓜嫩叶 DNA 条带清晰(未列出), 能够满足试验要求。提取处理后得到的 RNA 条带清晰, 纯度和完整性较好(部分检测结果见图 1), 反转录成 cDNA 后用于后续试验。

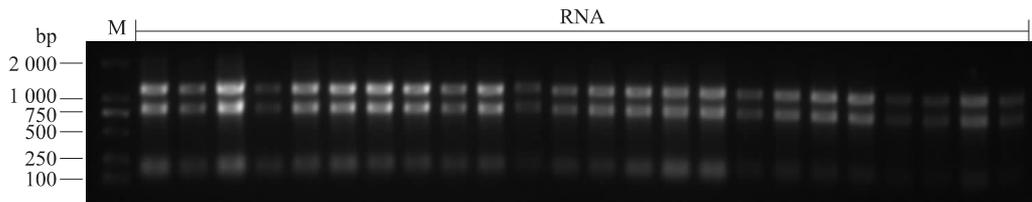


图 1 RNA 质量的电泳检测

Fig. 1 Quality analysis of RNA by electrophoresis

M: DNA marker DL2000; RNA: RNA 样品 RNA sample

2.2 *CsIPT2* 基因克隆和序列分析

以黄瓜 cDNA 和 gDNA 为模板, 用基因克隆引物进行 PCR 扩增, 得到 1 条约 1 000 bp 的亮带(图 2), 回收目的条带测序。测序结果显示序列全长 938 bp, 其中开放阅读框(ORF) 长度为 843 bp, 共编码 280 个氨基酸(图 3)。与黄瓜基因组数据库 *Csa001021* 基因编码区序列完全一致, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 表明已经成功获得目的基因。

2.3 *CsIPT2* 基因的同源性分析

将 *CsIPT2* 基因序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源比对分析, 发现该基因序列与桑树 (*Morus alba*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、苜蓿 (*Medicago truncatula*)、百脉根 (*Lotus japonicus*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、大豆 (*Glycine max*)、啤酒花 (*Humulus lupulus*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 和芜菁 (*Brassica rapa*) 等多种作物的 *IPT* 基因序列同源性均在 65% 以上, 说明该基因是一个比较保守的基因。

2.4 *CsIPT2* 蛋白性质和结构的预测分析

利用 ProtParam(www.expasy.ch/tools/protparam.html) 进行在线分析发现, 该蛋白包含 280 个氨基酸残基, 相对分子质量为 32 000, 理论等电点为 6.36, 由 20 种氨基酸组成。共包含 4 503 个原子, 原子组成是 C₁₄₄₁H₂₂₄₄N₃₉₆O₄₁₂S₁₀。该蛋白稳定系数 (instability index) 为 36.06, 是一个较稳定蛋白 (稳定系数大于 40 时不稳定)。脂肪指数 (aliphatic index) 为 88.79, 总平均亲水性 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.317, 表明该蛋白是疏水脂溶性蛋白。该序列含有 1 个高度保守的异戊烯基转移酶特征基元序列 [(A, G) - X₄ - G - K - (S, T)]。

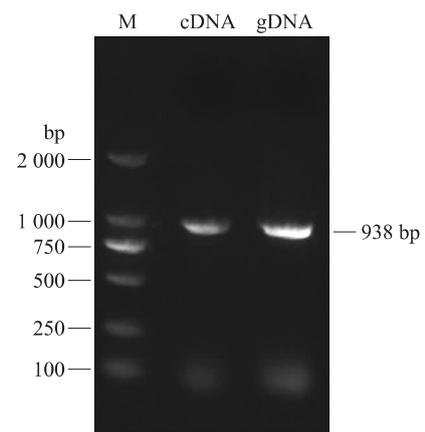


图 2 *CsIPT2* 基因 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of *CSIPT2* gene

M: DNA marker DL2000

```

1 M G A T G C G K S G L S V Q L A S H Y Q
1 ATGGGTGCCACGGGGTGC GGCAAATCTGGCTTATCCGTTAGCTAGCCTCTCACTATCAA
21 S E I I N C D K M Q V Y K G L D I T T N
61 TCTGAAATCATAAACTGCGACAAAATGCAGGTTTATAAAGGCTGGACATTACAACCTAAC
41 K I P L H E R H D V P H H L L G D V D S
121 AAGATTCCCCTTCAITGAACGACATGACGTCCCACACCATTACTCGGAGACGTCGATTCC
61 I H Q D F T P F H F R L R A D N V V S D
181 ATTACCAAGATTTCACTCCCTTTCACTTTAGACTCCGTGCCGACAATGTCGTTTCAGAT
81 I A S R N K L P I L V G G S N S F I H A
241 ATAGCCTCTAGAAACAACTACCTATTCTAGTAGGTGGTCCAACTCCTTCATTACGCA
101 M L V N H F N P N H D V F T P K S L I S
301 ATGCTCGTAAACCATTCAATCCAAACCACGACGTTTTCACTCCCAAATCCCTTATTTC
121 S H L R Y R C C F L W L D V E F P I L A
361 TCCCCTTACGTTACCGTTGTTGTTTCCCTTTGGTTAGACGTTGAGTTCCCATTTTGCC
141 E Y L S I R V D E M L Q I G M F E E L A
421 GAATATCTTTCCATTGAGTTGATGAAATGCTTCAAATCGGAATGTTGAGGAAATTAGCT
161 E F Y D P H T A E T M P Y T G I R K A I
481 GAGTTTTACGATCCCATAACAGCGGAAACCATGCCGTATACTGGGATTAGAAAGGCAATA
181 G V P E F D K Y F Q K N P P S K K S G I
541 GGAGTTCCGGAGTTTGATAAGTACTTCAAAAAACCCGCCAGTAAAAAAGTGGGATT
201 D R E A F E A V E A I K R N T H V L A
601 GATAGAGAAGCGTTTGAAGAAGCGGTTGAAGCCATAAAAAGGAATACCCACGTGCTGGCG
221 E R Q I G K I L K L K E A G W D I N V L
661 GAGAGACAGATAGGAAGATATTGAACTGAAAGAGCGGGTTGGGATATAAACGTGTTA
241 N A T E A F R A V V E P G T G R N R K E
721 AATGCAACGGAGCGTTTAGGGCGGTGGTGAACCGGGAACAGCCGGAACAGGAAGGAG
261 I W E K E I L E P S F R I V N R F L K E
781 ATTTGGAAAAGGAGATTTTGAACCAAGTTTTAGGATTGTCAACCGATTCTTGAAGGAG
281 *
841 TAG

```

图3 *CsIPT2* 基因序列与氨基酸序列比对图Fig. 3 *CsIPT2* gene sequence alignment with the amino acid

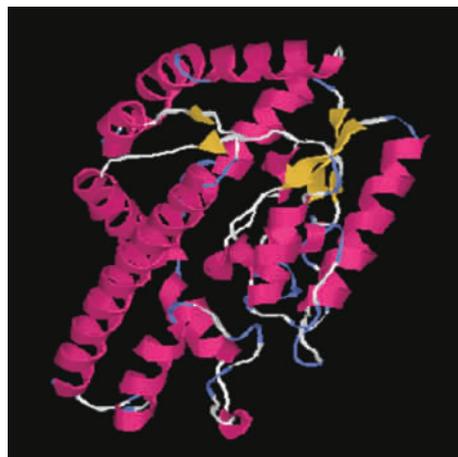
利用 I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 对 *CsIPT2* 进行蛋白空间结构预测(图4)。结果表明:该蛋白有14个 α -螺旋,5个 β -折叠,23个 β -转角,其空间结构模型与蛇麻(*Humulus lupulus* L.) IPT蛋白极其相似。应用 SigalP (http://bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html) 进行蛋白信号肽的预测,分析表明该蛋白不含信号肽。TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 亚细胞定位预测此蛋白在叶绿体和线粒体中存在的可能性极高,定位到其他细胞器的可能性较低。

2.5 *CsIPT2* 基因的启动子分析

在黄瓜基因组数据库中检索到 *CsIPT2* 基因上游2000 bp的启动子序列,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线工具对启动子元件进行分析(结果未列出)。结果表明:启动子除含有多个 CAAT-box 和 TATA-box 启动子区域基本转录元件外,还含有赋予高转录水平的调控因子5'UTR 嘧啶密集区(5'UTR Py-rich stretch),光应答响应元件 GT1-motif、ATCT-motif、GAG-motif、CATT-motif、TCCC-motif、Box I、I-box 和 Box4,脱落酸信号转导下游响应元件 ABRE,茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 和 TGACC-motif,水杨酸响应元件 TCA-element,MYBHv1 结合位点 CCAAT-box,真菌刺激响应元件 Box-W1,厌氧应答的响应元件 ARE,植物损伤响应元件 WUN-motif 和参与抗性和胁迫应答相关元件 TC-rich repeats 等。

2.6 *CsIPT2* 基因在果实发育过程中的表达分析

由图5可见,在单性结实材料 EC1 中虽然2个处理果实都能够膨大,但 *CsIPT2* 的表达情况不同。EC1 授粉处理的果实中, *CsIPT2* 的表达量在6 d急剧升高,8 d达到最大值;而在 EC1 未授粉处理中,基因表达在2 d时就达到峰值。在非单性结实材料 8419s-1 授粉处理的果实中,基因表达量在2 d达到峰值,而后逐步下降并趋向稳定。在未授粉处理中,2 d表达量降低,在4 d表达量出现回升。CPPU 处理的果实

图4 *CsIPT2* 蛋白结构预测Fig. 4 The protein structure prediction of *CsIPT2*红色: α -螺旋;黄色: β -折叠;蓝色: β -转角Red: α -helix; Yellow: β -sheet; Blue: β -turn

中 6 d 表达量达到最高值, 到 8 d 表达量降低。

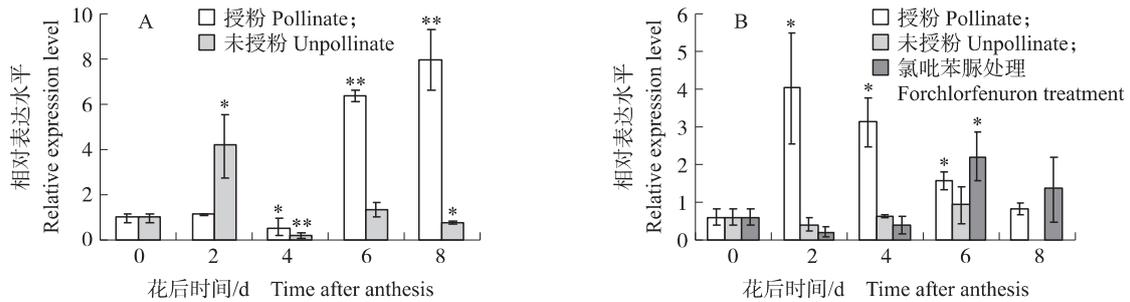


图 5 *CsIPT2* 在 EC1 (A) 和 8419s-1 (B) 果实发育过程中的表达分析

Fig. 5 The expression analysis of *CsIPT2* gene of EC1 (A) and 8419s-1 (B) during the fruit development of cucumber

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. The same as follows.

2.7 *CsIPT2* 基因对不同激素的应答

从图 6 可知, GA、ET、6-BA、ABA 和 NAA 5 种激素都能诱导基因 *CsIPT2* 的上调表达。其中 GA 处理后 3 h 基因表达量达到最高, 随后表达量降低。ET、6-BA、ABA 和 NAA 诱导的表达峰值出现在处理后 6 h。3 种浓度 (5、10 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 NAA 处理随着浓度的增加基因的表达量上调幅度增大。

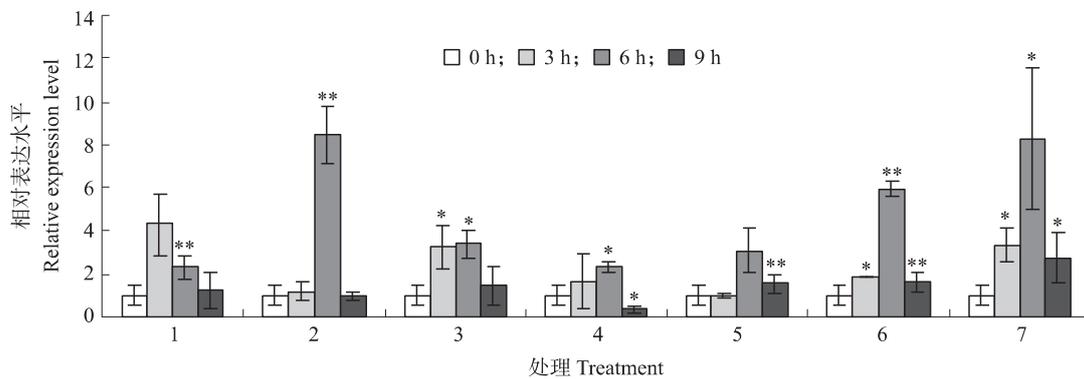


图 6 *CsIPT2* 基因在不同激素处理下的表达分析

Fig. 6 The expression analysis of *CsIPT2* gene after different hormones treatment

1: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA; 2: 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ET; 3: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA; 4: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA; 5: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA;

6: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; 7: 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA

3 讨论

本研究成功克隆到 *CsIPT2* 基因, 该基因全长 843 bp, 核苷酸序列与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、大豆 (*Glycine max*) 和番茄 (*Solanum lycopersicum*) 等多个物种的同源性在 65% 以上, 具有较高的保守性。共编码 280 个氨基酸, 具有 1 个高度保守的 IPT 特征基元序列 [(A, G) - X₄ - G - K - (S, T)], 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^[18]。其蛋白空间结构模型与蛇麻 (*Humulus lupulus* L.) IPT 蛋白极其相似, 进一步间接证明了其具有催化合成细胞分裂素的生化功能。*CsIPT2* 基因启动子中具有大量的抗性胁迫应答顺式响应元件, 该基因在抗性防御反应中发挥着重要作用^[10, 19]。

Cin 等^[20] 研究发现, 在苹果中细胞分裂素作为脱落的信号, 加速了果实的脱落。在本研究的 8419s-1 未授粉的处理中, 未发育的黄瓜子房在 8 d 脱落, 脱落前 6 d 的基因表达出现了上调, 推测 *CsIPT2* 基因的上调促进了细胞分裂素的合成, 促进了黄瓜果实的脱落。CPPU 处理后 2 d 基因的表达量下调, 表明外源的细胞分裂素反馈抑制了 *IPT* 基因的表达, 这与 Miyawaki 等^[21] 的研究结果相符; 随着外源细胞分裂素抑制作用的减弱, 基因的表达量逐渐升高, 并在 6 d 表达量达到峰值, 且显著高于授粉处理的表达量, 推测这可能是 CPPU 处理后黄瓜子房生长快于授粉处理的原因。*CsIPT2* 不仅在授粉后和天然的单性结实果实发育中表达量上调 (这与前期试验结果一致), 而且在黄瓜 CPPU 诱导的单性结实后期表达量升高, 推测该基因在促进黄瓜单性结实中发挥着重要作用。

本研究表明, GA、ET、6-BA、ABA 和 NAA 5 种激素都能诱导 *CsIPT2* 的上调表达, 但上调表达峰值出

现的时间点略有不同,这可能是由于 *CsIPT2* 基因对不同激素的应答路径不同导致反应时间的差异,也间接地证明细胞分裂素的合成受到其他激素的调控^[22]。

本研究通过对 *CsIPT2* 在黄瓜果实中和激素处理后的表达分析,明确了其在果实发育过程中的表达特征及对不同激素的应答情况。下一步计划对 *CsIPT2* 进行转基因研究,确定该基因的功能,探讨黄瓜单性结实的调控机制,从而为黄瓜单性结实新品种的选育奠定理论基础,以及为其他作物单性结实研究提供参考。

参考文献:

- [1] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. *Nature Genetics* 2009, 41: 1275 - 1281
- [2] Wan H J, Zhao Z G, Qian C T, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. *Analytical Biochemistry* 2010, 399: 257 - 261
- [3] Kim J G, Takami Y, Mizugami T, et al. CPPU application on size and quality of hardy kiwifruit [J]. *Scientia Horticulturae* 2006, 110: 219 - 222
- [4] Argueso C T, Ferreira F J, Kieber J J. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways [J]. *Plant, Cell and Environment* 2009, 32(9): 1147 - 1160
- [5] Marsch-Martínez N, Ramos-Cruz D, Reyes-Olalde J, et al. The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning [J]. *The Plant Journal* 2012, 72: 222 - 234
- [6] Chen C, Melitz D K. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures [J]. *FEBS Letters* 1979, 107(1): 15 - 20
- [7] Akiyoshi D E, Klee H, Amasino R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 5994 - 5998
- [8] Blackwell J R, Horgan R. Cytokinin biosynthesis by extracts of *Zea mays* [J]. *Phytochemistry* 1994, 35(2): 339 - 342
- [9] Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 16598 - 16603
- [10] Liu Y D, Yin Z J, Yu J W, et al. Improved salt tolerance and delayed leaf senescence in transgenic cotton expressing the *Agrobacterium IPT* gene [J]. *Biologia Plantarum* 2012, 56(2): 237 - 246
- [11] Mao Z C, Yu Q J, Zhen W, et al. Expression of *ipt* gene driven by tomato fruit specific promoter and its effects on fruit development of tomato [J]. *Chinese Science Bulletin* 2002, 47(11): 928 - 933
- [12] Brugiére N, Humbert S, Rizzo N, et al. A member of the maize isopentenyl transferase gene family *Zea mays isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2)*, encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development [J]. *Plant Molecular Biology* 2008, 67(3): 215 - 229
- [13] Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, et al. Ectopic expression of KNOTTED₁-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis gene in rice [J]. *Plant Physiology* 2006, 142: 54 - 62
- [14] Ye C J, Wu S W, Kong F N, et al. Identification and characterization of an isopentenyltransferase (*IPT*) gene in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Plant Science* 2006, 170(3): 542 - 550
- [15] Ando S, Asano T, Seiya T, et al. Changes in gene expression of putative isopentenyltransferase during clubroot development in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 2005, 67(2): 59 - 67
- [16] 张微微, 潘俊松, 刘淳中, 等. 黄瓜异戊烯基转移酶基因的克隆及序列分析 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版* 2010, 28(6): 487 - 491
- [17] 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: 420 - 408
- [18] Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276(28): 26405 - 26410
- [19] 王瑞刚. 植物防御反应的生化调控 [J]. *生物技术* 2002, 12(5): 41 - 44
- [20] Cin V D, Boschetti A, Dorigoni A, et al. Benzylaminopurine application on two different apple cultivars (*Malus domestica*) displays new and unexpected fruitlet abscission features [J]. *Annals of Botany* 2007(99): 1195 - 1202
- [21] Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate [J]. *The Plant Journal* 2004, 37(1): 128 - 138
- [22] Ozga J A, Reinecke D M. Hormonal interaction in fruit development [J]. *Journal of Plant Growth Regulation* 2003, 22: 73 - 81

责任编辑: 范雪梅