

丛汉卿, 齐尧尧, 朱文丽, 等. 木薯 *CKX* 基因的序列分析及其乙烯和茉莉酸甲酯诱导表达特性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 506-513.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.004

木薯 *CKX* 基因的序列分析及其乙烯和茉莉酸甲酯诱导表达特性

丛汉卿, 齐尧尧, 朱文丽, 陈松笔, 李 丽

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 木薯是一种重要的能源和淀粉作物, 具有较强的抗逆性。为阐明逆境信号调控细胞分裂素代谢关键基因 *CKX* 的分子机制, 对乙烯利和茉莉酸甲酯处理后的木薯品种华南八号叶片数字基因表达谱中两个表达差异显著的 *MeCKX* 基因进行了序列分析, 发现两者具有乙烯响应元件, 但没有茉莉酸响应元件。以华南八号悬浮培养细胞为材料, 利用 qRT-PCR 检测了木薯 *MeCKX1* 和 *MeCKX2* 基因在乙烯利和茉莉酸甲酯处理后的表达特性。结果显示: 茉莉酸信号可使这两个基因显著上调; 乙烯信号可使 *MeCKX1* 表达量缓慢上调, 使 *MeCKX2* 表达量缓慢下调。说明这两个 *MeCKX* 基因可被乙烯和茉莉酸信号调控, 并推测一方面其基因启动子区相应的特异响应元件参与了调控, 另一方面两种逆境信号物质分别通过影响其他调控途径, 间接造成这两个基因的不同表达, 以进一步影响细胞分裂素的代谢。

关键词: 木薯; *CKX* 基因; 乙烯; 茉莉酸; 表达分析

中图分类号: S533 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0506-08

Sequence analysis of *CKX* gene and expression characteristics induced by ethylene and methyl jasmonate in *Manihot esculenta* Crantz

CONG Han-qing, QI Yao-yao, Zhu Wen-li, CHEN Song-bi, LI Li

(Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important energy and starch crop, with strong stress resistance. In an attempt to illustrate the molecular mechanism of *CKX*, a key gene for cytokinin metabolism stimulated by stress signals in cassava, two differentially expressed *MeCKX* gene sequences were screened from Digital Gene Expression Profiling data with cassava SC8 leaves exposed to ethephon and methyl jasmonate. Sequence analysis shows that two *MeCKXs* have ethylene responsive elements, but no MeJA responsive elements in promoter regions. Expression patterns of *MeCKX1* and *MeCKX2* identified by quantitative real time PCR technique revealed that the two genes were up-regulated significantly after treated with methyl jasmonate. Ethylene treatment increased the *MeCKX1* expression and decreased the *MeCKX2* expression slowly.

The results suggest that two *MeCKX* genes could be regulated by ethylene and jasmine acid signals. It can also be inferred that some specific responsive elements in promoter regions might have participated in the expression regulation. Meanwhile, the two stress signals might have played roles in the metabolism of cytokinin by affecting other regulation pathways, resulting in differential expres-

收稿日期: 2015-10-11

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1630032014036)

作者简介: 丛汉卿 (1983-), 男, 山东潍坊人, 博士, 助理研究员, 主要从事分子生物学和生物信息学研究。(Tel)

13698948460; (E-mail) hiigara@yeah.net

通讯作者: 李 丽, (E-mail) chenli907@163.com

sions of two *MeCKXs*.

Key words: cassava; *CKX* gene; ethylene; jasmonate; expression analysis

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属于大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot*), 原产南美洲^[1], 是世界三大薯类作物之一, 也是第六大粮食作物, 具有非常重要的食用和工业价值。逆境胁迫能够通过影响内源激素水平调控植物的生长发育, 对于经济作物而言将严重影响产量, 研究木薯内源激素对逆境的响应特性和机制具有重要的科研意义和经济价值。

细胞分裂素 (Cytokinin, CK) 是植物生长发育过程中一种重要的激素, 参与许多生理生化过程, 如可以促进细胞的分裂和生长^[2]、诱导芽分化、延缓叶片衰老^[3]、消除顶端优势、促进侧芽生长^[4]等。CK 的降解由细胞分裂素氧化/脱氢酶 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase, *CKX*) 催化, 是目前已知的惟一的专一催化天然异戊烯类 CK 及其核苷的不可逆降解的酶, 如异戊烯基腺嘌呤 (isopentenyl adenine, iP)、玉米素 (zeatin, Z) 及其核苷等^[5]。*CKX* 是下调内源细胞分裂素水平的关键酶, 很多研究发现过表达 *CKX* 的转基因植株内源细胞分裂素水平与对照相比明显下降^[6-8]。

茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 和乙烯 (Ethylene, ET) 是植物逆境响应的信号分子, 在涉及植物对生物性和非生物性逆境胁迫和植物生长发育过程中的基因调控上发挥着重要的作用。JA 作为一种逆境信号传导物质, 具有诱导植物防御基因表达、调控植物对机械伤害、盐害、高温胁迫及紫外线照射等非生物胁迫的反应的功能^[9-11]。ET 是另外的植物生长调节物质, 可影响植物多个生长发育的过程, 对植物自身来说, 乙烯在种子萌发、开花、叶片伸展、根的生长、偏上生长、果实成熟及器官衰老等方面发挥着作用^[12-13]。对植物和外界环境的关系来说, 乙烯主要参与了植物面对外界生物与非生物胁迫的反应过程。很多涉及上述相关过程的基因序列上都有乙烯响应元件^[14-15]。

我们在早期的乙烯利和茉莉酸甲酯分别处理后以及未处理的 3 个木薯叶片数字基因表达谱测序分析中, 发现 *MeCKX1* (Manes.04G163300) 和 *MeCKX2* (Manes.09G010900) 的表达量存在显著差异。因为 *CKX* 是 CK 分解的关键酶, 为进一步

深入认识逆境信号如何影响木薯细胞分裂素的代谢, 我们对这 2 个基因进一步进行了生物信息学分析发现木薯 2 个 *CKX* 只具有乙烯响应元件。同时利用木薯悬浮培养细胞对 ET 和 MeJA 诱导表达特性分析中也发现 *MeCKX* 基因可受 ET 和 JA 信号调控, 并呈现不同的表达趋势。本研究旨在通过序列分析和表达分析, 确定 ET 和 JA 信号是否能对 *MeCKX* 基因表达造成影响, 并初步分析表达变化特性及其机制, 为研究木薯内源细胞分裂素的代谢奠定科研基础, 也有助于研究木薯种间差异, 为新品种选育提供条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

木薯品种华南八号 (SC8) 悬浮培养细胞, 该细胞通过叶片愈伤组织建立, 由中国热带农业科学研究院热带作物品种资源研究所提供。吸取处于指数增长期的悬浮培养细胞 1 ml 于离心管中并置于摇床, 25 °C 稳定 0.5 h, 分为 3 组, 其中 2 组分别以浓度为 400 μL/L 的乙烯利 (Solarbio) 与茉莉酸甲酯 (Sigma-Aldrich) 处理^[16-18], 另一组不进行任何处理作为对照。选取处理后 0.5 h、1.0 h、2.0 h、4.0 h、8.0 h 共 5 个时间点的样品, 微离心后弃上清液, 液氮速冻, -80 °C 冰箱保存。此步骤重复 3 次, 获得 3 批生物学重复。

1.2 *CKX* 基因及启动子区序列分析

使用 JGI 的木薯基因组数据库 (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Mesculenta_er) 获得 *MeCKX* 的 CDS 序列 (Coding sequence) 和 DNA 序列 (Genomic sequence)^[19]。用 Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>) 和 NetGene2 V2.4 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) 分析基因结构^[20-21]。用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 分析内含子相位^[22]。用 TSSP (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 分析转录起始位点^[23], 用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 综合分析启动子区序列, 寻找顺势作用元件

位点^[24]。

1.3 CKX 基因编码的蛋白分析

使用 Blast 工具对预测的氨基酸序列进行比对分析,用 PortParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 预测其蛋白分子量和等电点^[25],使用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测结构域^[26]。使用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测二级结构^[27]。利用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测三维结构^[28]。使用 PFP (<http://kiharalab.org/web/pfp.php>) 预测蛋白功能^[29]。

1.4 MeCKXs 的进化树分析

选取了拟南芥中发现的 7 个 CKX 基因^[30]、玉米中发现的 13 个 CKX 基因^[31]、水稻中发现的 11 个 CKX 基因^[32]和我们在木薯基因组中筛选获得的 11 个 CKX 同源基因[*MeCKX1* (Manes.04G163300)、*MeCKX2* (Manes.09G010900)、*MeCKX3* (Manes.03G034500)、*MeCKX4* (Manes.03G052900)、*MeCKX5* (Manes.05G154200)、*MeCKX6* (Manes.06G172800)、*MeCKX7* (Manes.08G054700)、*MeCKX8* (Manes.08G054800)、*MeCKX9* (Manes.16G085500)、*MeCKX10* (Manes.16G101300)、*MeCKX12* (Manes.18G021600)]的蛋白序列共同进行进化树分析。使用 MEGA6 软件对所有氨基酸进行序列比对后,构建邻接 (Neighbor-joining, N-J) 聚类进化树,选用 Bootstrap 方法进行 1 000 次重复对所构建的进化树进一步验证。

1.5 诱导表达的 qRT-PCR 检测

使用 Axygen 总 RNA 小量制备试剂盒 (Axygen) 提取总 RNA;使用 PrimeScriptTM Reverse Transcriptase 反转录试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA;

使用 SYBR Premix *Ex Taq* TM II 实时 (Perfect Real Time) 定量试剂盒 (TaKaRa) 进行 qRT-PCR,以检测 CKX 基因在悬浮培养细胞中受乙烯利和茉莉酸甲酯诱导表达的情况。所有的 qRT-PCR 反应均来自同一批反转录的 cDNA 产物,18S rRNA 为内参。所用目的基因及 18S rRNA 的引物均由 Primer premier 5.0 软件设计,序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 CKX 基因结构分析

对基因结构的分析发现 *MeCKX1* 和 *MeCKX2* 都具有 5 个外显子。转录起始位点预测显示,*MeCKX1* 和 *MeCKX2* 基因的转录起始位点分别位于起始密码子上游 261 bp 和 863 bp 处。对顺势作用元件位点的分析发现 *MeCKX1* 和 *MeCKX2* 都有一个 ERE 乙烯响应元件,不具有茉莉酸响应元件,两者还都具有水杨酸 (Salicylic acid, SA) 响应元件 (表 2)。除此之外,*MeCKX1* 和 *MeCKX2* 还各自具有一些特有胁迫响应元件,如 *MeCKX1* 的干旱响应元件 MBS 和缺氧条件响应元件 ARE 以及 *MeCKX2* 的生长素响应元件 TGA-element 等。

表 1 qRT-PCR 所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers for qRT-PCR

引物名称	序列
<i>MeCKX1</i> 正向引物	5'-TGGAAGTTGTTACAGGGAAAGG -3'
<i>MeCKX1</i> 反向引物	5'-ATGTGCTGAAGTCTGAGTAGAGGAT -3'
<i>MeCKX2</i> 正向引物	5'-GGTGAAATGGATGAGAATATTGTATT -3'
<i>MeCKX2</i> 反向引物	5'-CTTGAAGTGGGTCTTTGGGACT -3'
18S rRNA 正向引物	5'-ATGATAACTCGACGGATCGC -3'
18S rRNA 反向引物	5'-CTTGGATGTGCTAGCCGTTT -3'

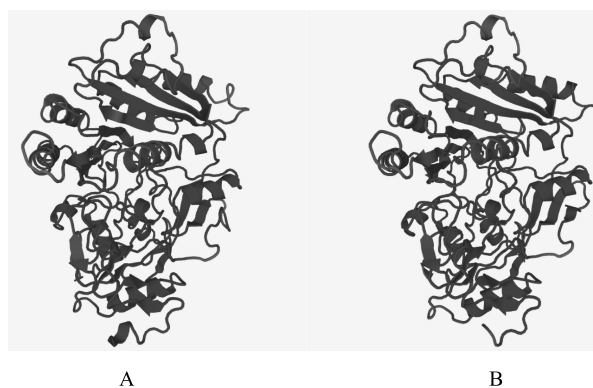
表 2 *MeCKX* 基因启动子顺式调控元件预测

Table 2 Functional predictions of cis-elements identified from the *MeCKX* promoter regions

基因启动子	胁迫响应元件	光响应元件	其余顺势调控元件
<i>MeCKX1</i>	ARE (无氧胁迫响应)、ERE (乙烯胁迫响应)、MBS (干旱胁迫响应)、TCA-element (水杨酸胁迫响应)、TC-rich repeats (防卫和胁迫响应)	ATCT-motif、Box 1、CATT-motif、G-Box、GATA-motif、GT1-motif、TCT-motif、chs-CMA2a	CAAT-box、GCN4_motif、Skn-1_motif、TATA-box、Unnamed _ 2、Unnamed _ 4、circadian
<i>MeCKX2</i>	ERE (乙烯胁迫响应)、TCA-element (水杨酸胁迫响应)、TGA-element (生长素响应)	ATCT-motif、Box 1、CATT-motif、G-Box、GAG-motif、GATA-motif、I-box、MRE、Sp1	5UTR Py-rich stretch、AAGAA-motif、CAAT-box、CAT-box、E2Fa、GCN4 _ motif、HD-Zip 1、HD-Zip 2、O2-site、TATA-box、Unnamed _ 2、Unnamed _ 4、circadian

2.2 CKX 蛋白分析

MeCKX1 有 531 个氨基酸,分子量为 60 139 600,理论等电点为 6.60;MeCKX2 有 603 个氨基酸,分子量为 67 886 800,理论等电点为 8.60。结构域分析结果表明 2 个蛋白都具有 Cytokinin-binding 和 FAD_binding_4 结构域。二级结构预测 MeCKX1 和 MeCKX2 都有 13 个螺旋结构和 16 个折叠结构。PFP 蛋白功能预测结果显示,2 个 CKX 基因最符合 Gene Ontology (GO) 中的 GO:0009690 条目,具有细胞分裂素代谢功能。通过蛋白特性的综合分析,可以看出涉及相同功能的同一类蛋白,无论一级结构的特性还是二级结构的特性,都非常接近。同时从预测的三维结构来看,MeCKX1 和 MeCKX2 的三维结构(图 1)非常类似,说明作为具有同样功能的同一蛋白家族成员,其结构也是类似的。



A: MeCKX1 三维结构; B: MeCKX2 三维结构。

图 1 MeCKX 三维结构预测

Fig.1 Prediction of 3D structure of MeCKX

2.3 基因进化树分析

通过序列比对,我们发现木薯 CKX 成员处于不同的进化分支上(图 2):本试验中的目的基因 MeCKX1 和 MeCKX2 与其他两个木薯 CKX 基因 MeCKX7、MeCKX8,与双子叶的拟南芥 AtCKX1,单子叶水稻 OsCKX4、OsCKX9,玉米 ZmCKX2、ZmCKX3,处于同一主要分支;MeCKX5 和 MeCKX11 与拟南芥 AtCKX5,水稻 OsCKX5,玉米 ZmCKX4、ZmCKX4b,处于同一主要分支;MeCKX3、MeCKX6 和 MeCKX10,与拟南芥 AtCKX2、AtCKX3、AtCKX4,水稻 OsCKX1、OsCKX2、OsCKX6、OsCKX7、OsCKX10,玉米 ZmCKX1、ZmCKX5、ZmCKX7、ZmCKX8、ZmCKX9,处于同一主

要分支;MeCKX4 和 MeCKX9 则与拟南芥 AtCKX7,水稻 OsCKX3、OsCKX8、OsCKX11,玉米 ZmCKX6、ZmCKX10、ZmCKX11、ZmCKX12,处于同一主要分支。植物中 CKX 基因的分化要早于单子叶植物与双子叶植物的分化及植物种属的分化^[33]。木薯中的 CKX 基因出现在不同分支上,跨越了单双子叶界限和种属间差异,也同样印证了上述理论,同时我们推测同一 CKX 基因成员在不同作物中可能具有相似的特性与功能。

2.4 茉莉酸甲酯和乙烯诱导 MeCKX 表达水平变化

为排除 CKX 基因本底变化造成的影响,将茉莉酸甲酯和乙烯诱导后的 qRT-PCR 表达量值除以相应对照的表达量值,图中值为 1 的横线代表本底表达水平,最终获得这 2 个基因在 2 种处理下的表达趋势。结果显示两者呈现不同趋势:MeCKX1 和 MeCKX2 在茉莉酸甲酯处理 0.5 h 后都呈现显著上升后又下降的趋势,MeCKX1 的变化更为剧烈,MeCKX2 在 2.0 h 到达最高点(图 3B),MeCKX1 在 2.0 h 后仍维持了上升趋势,并在 4.0 h 时达到 9 倍于本底水平,之后迅速回落(图 3A)。两者在乙烯处理后的表达变化却不尽相同,MeCKX1 在 0.5 h 后缓慢上升,并在 4.0 h 时达到了 2 倍,然后又回落到低于本底水平(图 3A);而 MeCKX2 在 0.5 h 后整体呈先缓慢下降后又逐渐回升的趋势(图 3B)。

3 讨论

细胞是植物基本的结构和功能单位,具有所有遗传信息。悬浮培养的细胞具有对外界信号响应一致的特点,尤其适用于那些相对表达量不高、容易被背景淹没的基因表达分析研究。本试验中木薯 CKX 基因在逆境信号物质施加后的半小时内即做出了响应,其中 MeCKX1 在整个过程中表达水平的变化最高为原来的 9 倍,且重复间误差均较小,表明本试验所选用的材料适用于基因表达分析的研究。

我们在启动子区元件分析时已知,MeCKX1 和 MeCKX2 都不具有茉莉酸响应元件,但有水杨酸响应元件和乙烯响应元件。茉莉酸甲酯处理后两基因都出现了非常显著的表达上调。这在一定程度上说明这两个基因并不直接受茉莉酸信号调控,而是一种间接调控模式。JA 途径和 SA 途径存在一定的拮

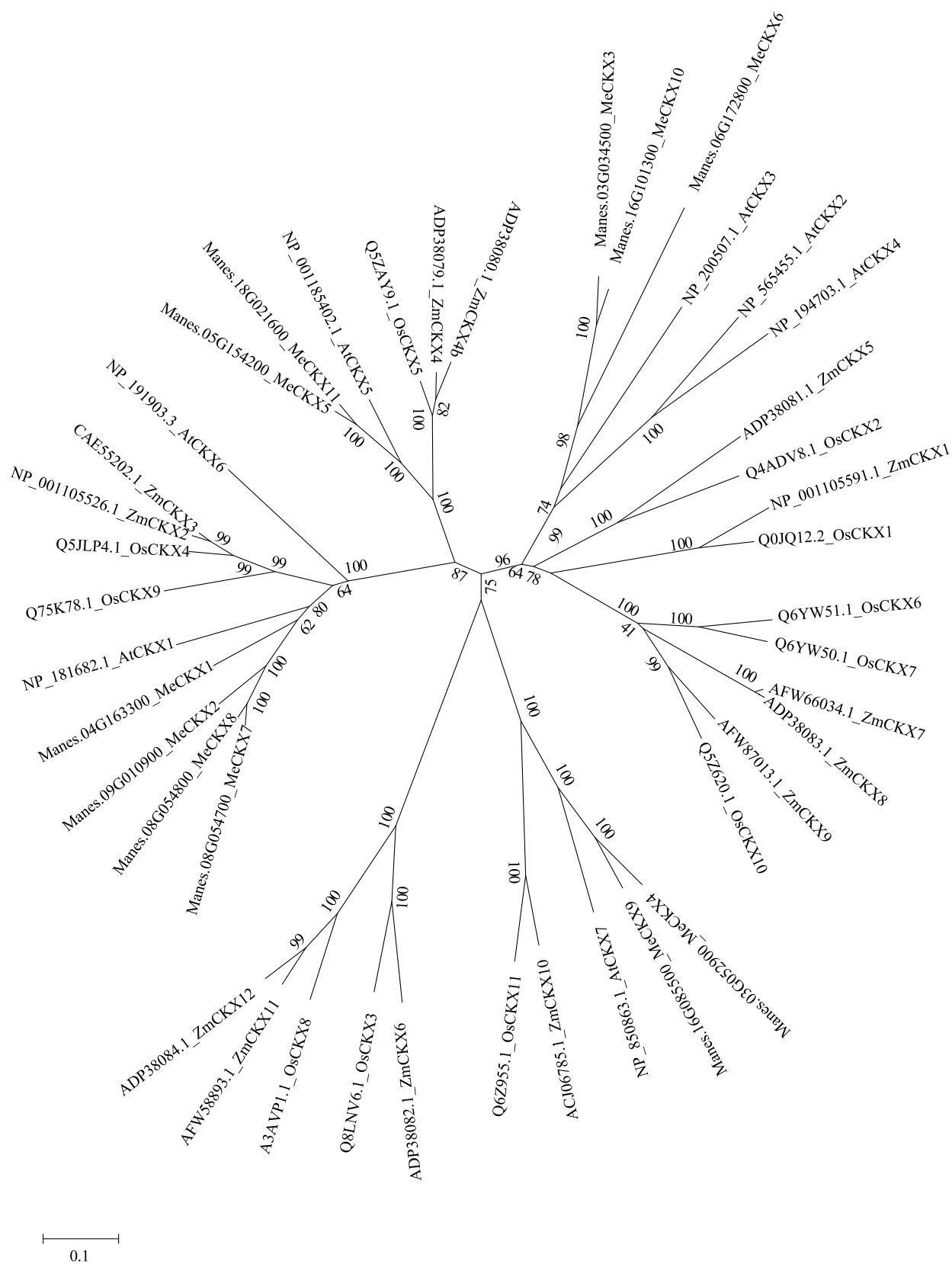
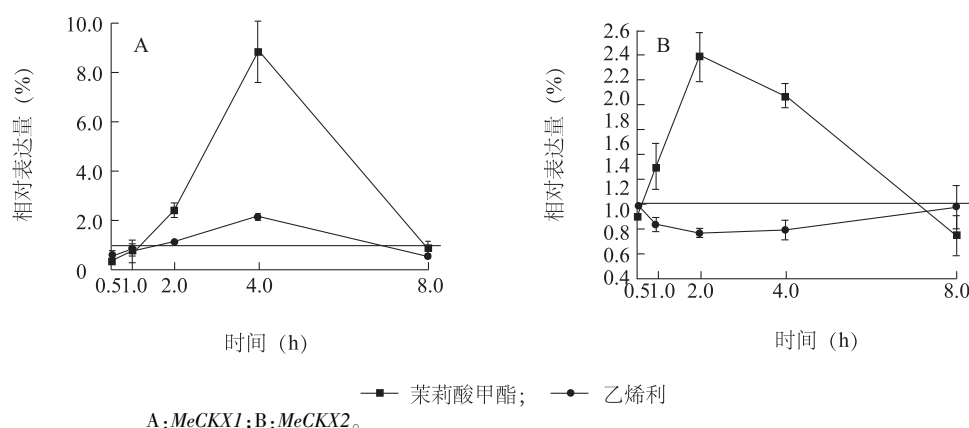


图2 木薯 CKX 蛋白的系统发生进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of cassava CKX proteins

图3 *MeCKX1* 和 *MeCKX2* 的 qRT-PCR 检测结果Fig.3 The expression levels of *MeCKX1* and *MeCKX2* detected by qRT-PCR

抗作用。Sano 等发现茉莉酸能通过抑制 SA 及其糖苷衍生物的合成,阻止病原侵染后所产生的水杨酸的增加^[34];也能抑制 SA 诱导的酸性病原相关蛋白 (PR) 基因的表达^[35]。尽管这两个 *CKX* 基因启动子区有水杨酸响应元件,但其上调可能并不是因为 JA 信号通过调控水杨酸信号对其进行了激活,必然有其他途径参与了调控,其具体机制仍需进一步探索。

此外,虽然 *MeCKX1* 与 *MeCKX2* 都具有乙烯响应元件,但面对乙烯信号初期却呈现相反的变化趋势,*MeCKX1* 上调,这可能是乙烯响应元件的作用,而 *MeCKX2* 下调,说明必然是由其他负调控引起。这也说明 JA 信号引起的 *MeCKX1* 和 *MeCKX2* 上调并不是通过间接调控乙烯信号来进行的。已有研究已指出,细胞分裂素可以通过调节 ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase) 蛋白的稳定性而促进乙烯的合成^[36],且细胞分裂素与乙烯的交叉反应可能是通过 AHPs (Arabidopsis thaliana histidine phosphotransfer proteins) 与乙烯受体 ETR1 (Ethylene resistant 1) 的互动,也可能是通过 ARRs 发生直接的交叉反应来进行的^[37]。细胞分裂素也可以通过促进乙烯的合成来抑制脱落酸所诱导的气孔关闭,脱落酸又可以诱导 CKX 的表达以调节细胞分裂素的降解^[38-39]。上述研究都是关于细胞分裂素如何对乙烯进行调控,而对于乙烯如何影响细胞分裂素的合成或代谢迄今为止没有相关报道。所以本试验中在乙烯响应元件存在的情况下,*MeCKX2* 为何没能像 *MeCKX1* 一样被乙烯信号上调,以及是

何机制在起抑制作用,还需要进一步的研究。

细胞分裂素可能是与其他信号通路互作或交叉反应最为活跃的植物激素,参与调控了植物生活周期中几乎所有的生长发育过程。植物遭受逆境胁迫时细胞分裂素能够产生响应并调控植物的生长发育。并且细胞分裂素还可以与其他内源激素共同作用,通过调节植物体内的生理变化来避免植物受病虫害干扰等,此外细胞分裂素还可以诱导和调控一些逆境胁迫相关的蛋白^[40]。因为细胞分裂素与光、其他激素以及一些营养物质等其他信号途径间存在着活跃的交叉反应,所以不像乙烯引起的“三重反应”,植物对细胞分裂素并没有很高的特异性反应^[41]。在植物的整个生活周期内、以及不同组织器官间、不同类型细胞中,茉莉酸和乙烯不仅可以互相影响,还可以与其他激素信号互相交叉作用。不同激素信号的整合共同介导了植物的生长发育、对环境的反应及衰老死亡。鉴于调控方式的复杂性,本试验中有哪些调控途径参与了具体调控还需进一步探索,但我们推测乙烯和茉莉酸这两种不同逆境信号施加后,一方面其基因启动子区相应的特异响应元件参与了调控,如乙烯响应元件 ERE 在乙烯信号影响下上调 *MeCKX1* 的表达。另一方面两种逆境信号物质分别通过影响其他调控途径,间接造成这两个基因的不同表达,如 *MeCKX2* 在有乙烯响应元件 ERE 存在的情况下却出现下调,以及在缺少茉莉酸响应元件的情况下,茉莉酸甲酯仍可显著提高这两个基因的表达水平。

木薯作为一种具有较强抗逆性的重要粮食作物

及工业酒精和淀粉来源,研究细胞分裂素对其生长发育的作用具有重要的科研意义和经济价值。*MeCKX* 作为控制木薯内源细胞分裂素代谢的重要基因,研究逆境信号如何对其造成影响并探索相关机制,一方面可以为研究木薯内源细胞分裂素的代谢奠定科研基础,另一方面也有助于研究木薯种间差异,为新品种选育提供条件。目前我们已知木薯的 *CKX* 基因可受到乙烯和茉莉酸信号影响,并已初步确定其表达特性,但具体的信号转导路径和调控机理,仍需进一步的探索和验证。

参考文献:

- [1] LABAN T F, KIZITO E B, BAGUMA Y, et al. Evaluation of Ugandan cassava germplasm for drought tolerance [J]. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 2013, 5(3): 212-226.
- [2] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro [J]. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1957, 54: 118-130.
- [3] RICHMOND A E, LANG A. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves [J]. Science, 1957, 125: 650-651.
- [4] SACHS T, THIMANN K V. Release of lateral buds from apical dominance [J]. Nature, 1964, 201: 939-940.
- [5] 邓江明, 潘瑞炽. 细胞分裂素氧化酶 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 370-375.
- [6] GALUSZKA P, FRDBORT L, SEBELA M, et al. Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268: 450-461.
- [7] KOPEČNÝ D, TARKOWSKI P, MAJIRA A, et al. Probing cytokinin homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by constitutively overexpressing two forms of the maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 gene [J]. Plant Science, 2006, 171: 114-122.
- [8] WERNER T, KÖLLMER I, BARTRINA I, et al. New insights into the biology of cytokinin degradation [J]. Plant Biol, 2006, 8: 1-12.
- [9] CONCONI A, SMERDON M J, HOWE G A, et al. The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation [J]. Nature, 1996, 383 (6603): 826-829.
- [10] TURNER J G, ELLIS C, DEVOTO A. The jasmonate signal pathway [J]. Plant Cell, 2002, 14 (suppl.): 153-164.
- [11] 姜宗庆, 汤庚国, 肖文华, 等. 茉莉酸对高温胁迫下银杏盆栽苗木叶片生理特性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 211-212.
- [12] 张鹤华, 薛进军, 侯延杰, 等. 乙烯利和萘乙酸输液滴干对核桃青皮开裂率及果实品质的影响 [J]. 南方农业学报, 2015, 46(6): 1058-1062.
- [13] 郭 瑾, 薛永来, 杜道林. 植物激素调控拟南芥根系发育的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 7-10.
- [14] BLEECKER B, KENDE H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000, 16: 1-18.
- [15] JOHNSON P R, ECKER J R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective [J]. Annual Review of Genetics, 1998, 32: 227-254.
- [16] DANIJELA D, ROBERT B, SUSAN H. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 110(1): 104-108.
- [17] CONG H Q, LI Z Y, XU L. Characterizing developmental and inducible differentiation between juvenile and adult plants of *Aechmea fasciata* treated with ethylene by transcriptomic analysis [J]. Plant Growth Regulation, 2013, 69: 247-257.
- [18] ISMAIL A, RIEMANN M, NICK P. The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 2127-2139.
- [19] PROCHNIK S, MARRI P R, DESANY B, et al. The cassava genome: current progress, future directions [J]. Tropical Plant Biology, 2012, 5: 88-94.
- [20] BRUNAK S, ENGELBRECHT J, KNUDSEN S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence [J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 220: 49-65.
- [21] HEBGAARD S M, KORNING P G, TOLSTRUP N, et al. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(17): 3439-3452.
- [22] HU B, JIN J P, GUO A Y, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [23] SOLOVYEV V V, SHAHMURADOV I A. PromH: promoters identification using orthologous genomic sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3540-3545.
- [24] LESCOT M, DÉHAIS P, MOREAU Y, et al. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [25] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [26] HUNTER S, APWEILER R, ATTWOOD T K, et al. InterPro: the integrative protein signature database [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl.1): 211-215.
- [27] JONES D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292: 195-202.
- [28] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [29] KHAN I K, WEI Q, CHITALE M, et al. PFP/ESG: automated

- protein function prediction servers enhanced with gene ontology visualization tool[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(2): 271-272.
- [30] WERNER T, MOTYKA V, LAUCOU V, et al. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2532-2550.
- [31] GU R, FU J, GUO S, et al. Comparative expression and phylogenetic analysis of maize cytokinin dehydrogenase/oxidase (*CKX*) gene family[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29: 428-440.
- [32] ASHIKARI M, SAKAKIBARA H, LIN S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production[J]. *Science*, 2005, 309(5735): 741-745.
- [33] THOMAS S. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species[J]. *Journal of Plant Research*, 2003, 116(3): 241-252.
- [34] SANO H, SEO S, KOIZUMI N, et al. Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants[J]. *Plant Cell Physiology*, 1996, 37: 762-769.
- [35] NIKI T, MITSUBARA I, SEO S, et al. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein gene in wounded mature tobacco leaves [J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, 39: 500-507.
- [36] CHAE H S, FAURE F, KIEBER J J. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 545-559.
- [37] MIZUNO T. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2005, 69: 2263-2276.
- [38] BRUGIERE N, JIAO S, HANTKE S, et al. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1228-1240.
- [39] TANAKA Y, SANO T, TAMAOKI M, et al. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 2259-2266.
- [40] 陈梦莹,陈祥福,崔 萌,等. *ipt* 基因在植物基因工程中的应用[J]. *长江蔬菜*, 2014(16): 9-13.
- [41] MOK D W, MOK M C. Cytokinin metabolism and action[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52: 89-118.

(责任编辑:陈海霞)