

二穗短柄草细胞分裂素氧化酶 *BdCKX* 编码基因的克隆及功能分析

李 嘉, 周 雪, 李婷婷, 王中华, 权 力

(西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 细胞分裂素是一类重要的植物激素, 通过控制细胞分裂、诱导促进芽萌发生长等方面控制植物发育。细胞分裂素的代谢主要通过细胞分裂素氧化酶来进行, 在作物性状改良和抗旱品种培育方面具有重要的研究价值。为研究麦类作物细胞分裂素氧化酶功能, 本实验采用同源克隆的方法, 在二穗短柄草中获得了一个与拟南芥细胞分裂素氧化酶基因 *AtCKX3* 高度同源的候选基因, 命名为 *BdCKX*。将该基因与 pCXS_N 质粒连接构建植物超表达载体, 并以农杆菌介导法转化二穗短柄草植物幼胚。所获得的阳性转基因植株生长迟缓, 茎短, 叶片小, 地上部分变小。另外, 组织表达谱分析表明 *BdCKX* 在二穗短柄草生长发育的不同时期和不同组织中具有不同的表达模式, 在生长 40 天的植株叶片中表达量有明显升高。由于细胞分裂素氧化酶编码基因在早熟禾亚物种中较为保守, 本研究为理解麦类作物的发育调控机制和遗传改良麦类作物生长提供必要的理论基础。

关键词: 二穗短柄草; CKX 基因; 超表达; 细胞分裂素

中图分类号: S336 **文献标志码:** A

Cloning and functional analysis of a *BdCKX* gene in *Brachypodium distachyon*

LI Jia, ZHOU Xue, LI Ting-ting, WANG Zhong-hua, QUAN Li

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: As one of the most important plant hormones, cytokinin plays diverse roles during plant development including regulation of cell division, promotion of shoot growth etc. The metabolism of cytokinin is primarily dependent on functions of cytokinin oxidase encoding genes. To gain insightful understanding and take full advantage of cytokinin oxidase in the genetic improvement of crop growth traits, a homologous gene to the *AtCKX3* (*Arabidopsis Cytokinin Oxidase 3*) gene in *Brachypodium distachyon*, *BdCKX*, was cloned. To elucidate its biological function, CDS sequence of the *BdCKX* gene was amplified and ligated with the pCXS_N vector, which was then introduced to callus tissue of young embryo by *Agrobacterium*-mediated transformation for over-expression analysis. Positive transformants exhibited phenotypes including short stem, shrunk leaf, retarded development, and small overall shoot. It could be concluded that the elevated expression of *BdCKX* gene was able to interfere plant growth through the degradation of endogenous cytokinin levels. In addition, gene expression profile indicated that *BdCKX* was differentially expressed in various tissues at different developmental stages. In particular, expression level of *BdCKX* was markedly shifted in leaf of 40 days old seedling. Because cytokinin encoding genes were conserved among Pooideae species, our research may provide a theoretical base for the regulatory mechanism and genetic improvement of Triticeae crops.

Keywords: *Brachypodium distachyon*; CKX; overexpression; cytokinin

干旱是造成农作物减产甚至大面积死亡的主要自然灾害之一。据测算, 全球每年因干旱造成的经济损失高达 60~80 亿美元, 远远超过了其它自然灾

害^[1]。因此, 如何利用生物技术手段, 从植物本身出发, 揭示其抗旱特性, 对于安全应对粮食危机、实现水资源的合理利用和改善生态环境均有着重要意

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2014JQ3095); 陕西省遗传育种新技术团队(2014KCT-25); 中央高校基本科研业务费专项(Z109021426)

作者简介: 李嘉(1990—), 内蒙古包头人, 硕士, 研究方向为作物抗旱机理。E-mail: jiamibaobi@126.com。

通信作者: 权力, E-mail: lquan@nwfu.edu.cn。

义^[2-3]。培育抗旱品种的关键在于改良根系。在小麦的相关研究中有结果表明,纵深发达的根系系统可使植物充分吸收利用贮存在土壤中的水分,提高资源利用效率^[4]。根系的生长一方面受到环境的影响,另一方面也离不开内源激素的调节。作为一类重要的植物激素,细胞分裂素在调控根系的维管组织发育^[5]、根细胞的生长^[6]、根系统的向地性^[7]、不定根和侧根的生长发育^[8]及根系分生组织活性^[9]等多方面,均发挥着不可忽视的作用。

细胞分裂素的降解代谢主要依赖于细胞分裂素氧化酶(cytokinin oxidase,CKX)。CKX 特异性地降解细胞分裂素 N6 位置的不饱和侧链而使其彻底失去活性^[10-11],从而有效下调植物内源细胞分裂素水平,是植物维持体内细胞分裂素动态平衡的一种重要方式。有研究表明,在拟南芥中分别过量表达 *AtCKX* 家族基因,可使内源细胞分裂素水平下调 30% ~ 45%,其中以 *AtCKX3* 的下调效果较为显著^[5]。在烟草中过表达 *AtCKX1* 基因,与对照相比,转基因烟草根部鲜重增加约一半^[12]。此外,有研究认为 *OsCKX2* 是在水稻中控制穗粒数的主效基因,与拟南芥 *AtCKX2* 基因具有相似功能^[13]。超表达 *ZmCKX* 基因的转基因玉米在花粉或花药专一启动子的控制下表现雄性不育^[14]。在植物生长的不同阶段和不同部位 *CKX* 基因家族的表达模式也存在较大差异^[15-16]。因此,CKX 基因作为下调植物内源细胞分裂素水平的重要基因,在定向改良作物性状、培育优良品种方面具有值得发掘的研究潜力。

通过使用拟南芥 *AtCKX* 蛋白序列与二穗短柄草数据库比对,发现二穗短柄草可能编码 10 个 *CKX* 基因,但其相关功能未见报道。本实验通过 BLASTP 比对以及蛋白序列分析结果,选择了与 *AtCKX3* 蛋白序列相似度较高的 *BdCKX* 基因(基因序列号为 *Bradi1g37470*)进行功能研究。通过同源分子克隆获得 *BdCKX* 基因并构建植物超表达载体,继而采用农杆菌介导法转化模式植物二穗短柄草。同时,为解析 *BdCKX* 基因的工作模式,本研究利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *BdCKX* 基因在二穗短柄草不同生长发育时期的组织表达谱。由于 *CKX* 基因在早熟禾亚科植物中相对比较保守,因此,本研究能够丰富麦类作物品种改良的理论依据,为加快作物遗传改良、培育抗旱型作物提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料及生长条件

本实验以二穗短柄草 Bd21 为材料,在 22℃ 光

照培养箱中采用长光照进行培养(16 h 见光/8 h 暗光);所用土壤为通用的植物培养基质;花盆规格为 5.5 cm × 5.5 cm × 5.5 cm;pCXS_N 表达载体和农杆菌 EHA105 由本实验室保存;RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 TIANGEN(北京)公司,荧光定量试剂盒购于 Takara 公司;引物由上海立菲生物技术有限公司合成。

1.2 研究方法

1.2.1 *BdCKX* 基因的序列分析 相关的生物信息学分析工具如下:

BLASTP 比对分析和序列来源 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>);

蛋白质一级结构分析 (<http://web.expasy.org/protparam/>);

蛋白质二级结构分析 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html);

蛋白质保守域分析 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>);

亚细胞定位 (<http://psort.hgc.jp/form.html>);

蛋白活性位点预测 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html)。

1.2.2 *BdCKX* - pCXS_N 超表达载体构建 以 *AtCKX3* 蛋白序列为查询序列,在 phytozome 10.3 (www.phytozome.net) 中的二穗短柄草数据库进行 BLASP 比对搜索。选择同源性最高的 *Bradi1g37470* 基因作为研究候选基因,进行同源克隆分析研究对象。借助 Oligo 6 软件设计引物,以二穗短柄草 DNA 为模板,使用 Pfu DNA 聚合酶扩增。PCR 反应程序为:95℃ 2 min;95℃ 30 s;57℃ 30 s;72℃ 2 min;33 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收目的片段,连接到 pCXS_N 载体并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞。经上海生物工程技术服务公司测序验证后保存在 -80℃ 冰箱,完成载体构建。

1.2.3 *BdCKX* 基因的克隆及转化 为了进一步验证 *BdCKX* 基因的生物学功能,本实验采用高保真酶扩增得到全长为 1903 bp 的 *BdCKX* 基因开放读码框的 DNA 片段(图 1)。连接 pCXS_N 表达载体后,挑取单克隆送往上海生工生物工程有限公司进行测序。测序结果经验证无误后,转入农杆菌 EHA105 菌株。

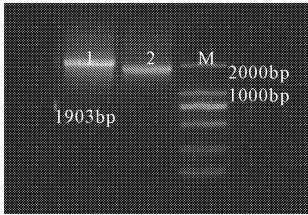


图 1 *BdCKX* 基因扩增结果

Fig.1 Amplification result of the *BdCKX* gene

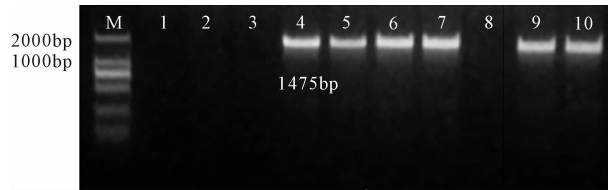


图 2 *BdCKX* - pCXSN 转基因植株 PCR 验证

Fig.2 Identification of *BdCKX* - pCXSN transgenic plants by PCR

为了准备侵染材料,我们在无菌条件下使用解剖镜挑取二穗短柄草幼胚,一个月后选择黄色的愈伤块继代培养。待愈伤块生长至直径约 1 cm 时与农杆菌共培养,利用农杆菌将目的基因导入二穗短柄草。农杆菌每侵染 1 次需要收集 300 个愈伤块,共侵染 4 次。经过潮霉素筛选抑制非阳性愈伤的生长,1 个月后转入光照培养箱进行生芽、生根培养。

待组培苗高约 5 cm 时将丛生芽分离,分别移栽到育苗基质中,放入恒温光照培养箱中生长。待组培苗成活后,提取叶片 DNA,并用潮霉素 (Hygromycin, Hyg)引物检测,扩增出 1475 bp 的片段(图 2),确定为阳性苗,可用于后续表型观察。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 成熟二穗短柄草种子剥去颖壳后放于培养皿中,加入适量超纯水,在 4℃ 下静置 2 d。然后转移到光照培养箱中,在 22℃,18 h 光照/6 h 黑暗条件下萌发。待真叶长出后,将幼苗插入漂浮板,置于装有超纯水的 1 L 烧杯中,培养条件不变。10 d 后分别用剪刀收集叶片和根部材料,用锡箔纸包裹在液氮中速冻并于 - 80℃ 冰箱保存。同批余下幼苗则移栽到培植土中,第 20 天开始每隔 10 d 挖取部分植株,收集叶片和根部材料各 3 份作为生物学重复,保存于 - 80℃ 冰箱,直至第 50 天。

采用 TaKaRa 公司 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) 荧光定量试剂盒, BIO - RAD CFX 实时荧光定量 PCR 仪对 *BdCKX* 基因的表达量进行检测。以二穗短柄草 *Actin* 基因作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,分析 *BdCKX* 基因在根与叶中不同时期的相对表达量。

本研究所采用的引物序列及对应基因见表 1。

表 1 本研究所用引物序列及用途

Table 1 Primer sequences and application in this study

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5' - 3')	用途 Purpose
<i>Bradi1g37470</i>	F: ATGCCGAGGGCTAGTCTAGC	载体构建 Construction of pCXSN vector
	R: GGATGCCGAGATTAAAGTGGGT	载体构建 Construction of pCXSN vector
<i>Bradi1g37470</i>	F: GAAGATCTCTCTGCCCTTGAC	定量引物 qRT - PCR
	R: GGTCTCTACTATGTGTCCGAAATC	定量引物 qRT - PCR
<i>Actin</i>	F: GACCTTCAACACTCTGTCTATG	定量引物 qRT - PCR
	R: CGCCAGAATCCAGCACAATA	定量引物 qRT - PCR
<i>Hyg</i>	F: AAAACGACGGCCAGTGAATT	阳性苗筛选 Positive selection
	R: TTAAGTGGCTGAGGCGTTCT	阳性苗筛选 Positive selection

2 结果分析

2.1 BdCKX 蛋白结构与功能预测

虽然不同来源的 CKX 蛋白结构有差异,但它们约有 1/3 的氨基酸序列高度保守。所以我们通过拟南芥 AtCKX3 蛋白序列在短柄草数据库中进行 BLASTP 比对,选择同源性较高的 BdCKX,通过在线软件分析蛋白结构和预测蛋白功能。一级结构分析结果表明:BdCKX 共有 538 个氨基酸残基,其中正电

荷氨基酸数为 49,负电荷氨基酸数为 55,分子质量为 58.3232 kD,理论等电点 6.08,半衰期大于 10 h。根据预测说明,不稳定指数以 40 为界,大于 40 预测蛋白稳定,小于 40 预测蛋白则不稳定。BdCKX 不稳定指数为 39.46,预测为不稳定蛋白。

通过 GOR4 方法对 BdCKX 二级结构进行在线分析, BdCKX 的二级结构以 33.09% 的 α 螺旋和 50.37% 的无规则卷曲为主要结构原件,延伸链较少,所占百分比为 16.54%(表 2)。由此推测, α 螺旋

和无规则卷曲是 BdCKX 蛋白中最大量的结构元件,延伸链散布于整个蛋白质中。根据蛋白质保守域分析结果,BdCKX 具有保守的黄素腺嘌呤二核苷酸结合域和细胞分裂素结合域,这是 CKX 家族共有的蛋白结构特征。

表 2 BdCKX 二级结构典型构象统计结果

Table 2 Secondary structure prediction of BdCKX

二级结构类型 Secondary structure	氨基酸残基数目 Amino acid number	百分比/% Percent
α 螺旋 α -helix	178	33.09
延伸链 Extended strand	89	16.54
无规则卷曲 Random coil	271	50.37

应用 Psort 工具对 BdCKX 进行亚细胞定位预测,结果表明该蛋白可能定位于过氧化物酶体或内质网,最有可能作为分泌蛋白定位于细胞外(表 2),这与 BdCKX 具有细胞分裂素氧化酶的功能这一假设是相吻合的。

表 4 BdCKX 在 NPS 中的活性位点预测分析

Table 4 Scanning of BdCKX for site/signatures against proscan database in NPS

活性位点名称 Active site	序列号 Prosite accession number	膜体类型 Motif model	氨基酸序列 Amino acid sequence	概率值 P-value
N-糖基化位点 N-glycosylation site	PS00001	$N - \{P\} - [ST] - \{P\}$	133 - 136 NVSV 287 - 290 NRTL	5.138×10^{-3}
蛋白酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS00005	$[ST] - x - [RK]$	95 - 97 SPR 102 - 104 SSR 156 - 158 TLR 525 - 527 SAR	1.423×10^{-2}
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	$[ST] - x(2) - [DE]$	36 - 39 SALD 74 - 77 SPSD 289 - 292 TLTE 301 - 304 SASE 437 - 440 TPDE	1.482×10^{-2}
cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白 激酶磷酸化位点 cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	PS00004	$[RK](2) - x - [ST]$	294 - 297 RRSS	1.572×10^{-3}
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	$G - \{EDRKHPFYW\} - x(2) - [STAGCN] - \{P\}$	23 - 28 GLASG 98 - 103 GQGHSS 105 - 110 GQALAS 125 - 130 GGDHGR 177 - 182 GTLSN 178 - 183 GTLSNA 404 - 409 GVFKGI 447 - 452 GLLRSA 497 - 502 GNKWSW 521 - 526 GIFPSA	1.397×10^{-2}
酰化位点 Amidation site	PS00009	$x - G - [RK] - [RK]$	128 - 131 HGRR 292 - 295 EGRR	8.636×10^{-4}
氧化还原酶类 FAD 共价结合位点 Oxygen oxidoreductases covalent FAD-binding site	PS00862	$[LIVMFA] - x - \{GPRV\} - [LIVMFYC](2) - \{LPC\} - [STAC] - [GSTANQEKR] - [STALV] - [HY] - [LIVMF] - G$	12 - 23 VTSLFSTASHLG	1.104×10^{-6}
Ribosomal protein S2 signature 1	PS00962	$[LIVMFA] - x - \{GPRV\} - [LIVMFYC](2) - \{LPC\} - [STAC] - [GSTANQEKR] - [STALV] - [HY] - [LIVMF] - G$	12 - 23 VTSLFSTASHLG	1.104×10^{-6}

表 3 BdCKX 的亚细胞定位预测结果

Table 3 Prediction on subcellular location of BdCKX

亚细胞定位 Subcellular location	概率 Probability
细胞外 Outside	0.37
过氧化物酶体 Microbody(peroxisome)	0.26
内质网 Endoplasmic reticulum(membrane)	0.10
内质网 Endoplasmic reticulum(lumen)	0.10

磷酸化是生物体内普遍的一种调节方式,在细胞信号转导和蛋白调控中起到重要作用。根据 Prosite Scan 分析结果,BdCKX 有蛋白酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点三类磷酸化位点,此外还有 N-糖基化位点、N-豆蔻酰化位点、酰化位点、氧化还原酶类 FAD 共价结合位点和 Ribosomal protein S2 signature 1(表 4)多种活性位点,为其发挥催化作用提供结构基础。

2.2 BdCKX 组织表达谱分析

为了明确 *BdCKX* 基因在二穗短柄草不同生长时期、不同生长部位的表达特征,我们采用实时荧光定量 PCR 方法,分别检测生长时期为 10 d、20 d、30 d、40 d、50 d 的二穗短柄草地上部分和地下部分中 *BdCKX* 基因的表达量。结果表明(图 3):在根中, *BdCKX* 表达量较平稳,且持续低于叶中的表达量;在叶中,前 30 天 *BdCKX* 表达量变动不大,但是在第 40 天的样本中,表达量显著升高,相对表达量为 3.77,与同期根部表达量的差值为 3.55。在第 50 天的样本中,根与叶中 *BdCKX* 的表达量基本一致。证明 *BdCKX* 在一定程度上参与二穗短柄草不同生长发育阶段的特异性调节,并在根与叶中呈现一定差异。

2.3 二穗短柄草 *BdCKX* - pCXS_N 转基因植株表型分析

与野生型植物对照相比,二穗短柄草转 *BdCKX*

- pCXS_N 的阳性植株有异常表现。在滤纸上萌发 10 d 的转基因植株相比于对照,叶片变小,根部变短,植株整体较小(图 4a)。在育苗基质中生长 40 d 后,转基因植株地上部分明显小于对照,株高短,叶片少(图 4b)。说明在二穗短柄草根部与地上部的整体形态建成中, *BdCKX* 起到了一定作用。

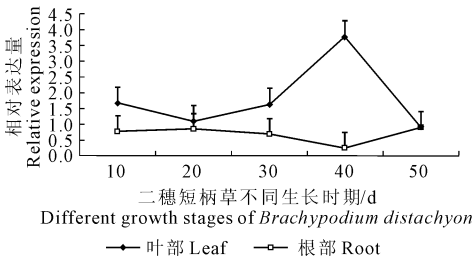
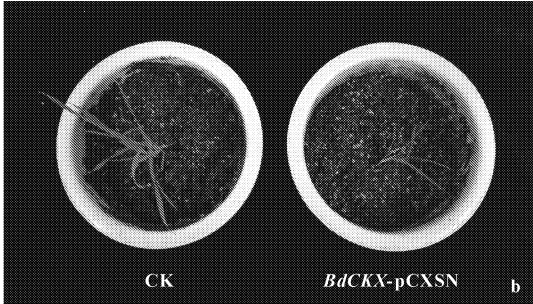
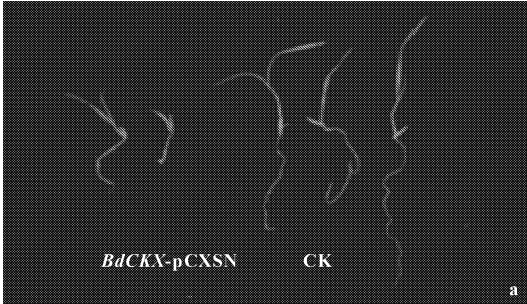


图 3 *BdCKX* 基因表达差异

Fig. 3 Expression profile of *BdCKX* in root and leaf of *Brachypodium distachyon* at different growth stages



注:a. 10 天大小植物; b. 40 天大小植物。 Note: a. 10 days old seedlings; b. 40 days old plants.

图 4 *BdCKX* - pCXS_N 植株与对照表型对比

Fig. 4 Phenotype comparisons between the positive *BdCKX* - pCXS_N and the control plants

3 讨 论

本研究从二穗短柄草中得到一个细胞分裂素氧化酶基因 *BdCKX* 的基因全长,通过序列分析发现该基因编码的蛋白含有多种催化功能所需的活性位点,且具有保守的黄素腺嘌呤二核苷酸结合域和细胞分裂素结合域,有可能以分泌蛋白的形式发挥作用。这些结果表明, *BdCKX* 作为 CKX 家族同源蛋白,有可能与其它 CKX 有着相似的结构和功能,在内源细胞分裂素的氧化降解方面发挥着一定作用。

组织表达谱分析结果表明:在二穗短柄草生长发育的前 30 天 *BdCKX* 基因表达较平稳,在第 40 天时叶部表达量明显升高,同时根部表达量有所降低,这可能与细胞分裂素作为一种信号分子,在调控不同生长发育时期植物不同生长部位所起到的不同作用有关。2010 年 Werner 等^[12]通过转拟南芥 *AtCKX1* 基因的烟草实验证明,细胞分裂素所调控的植物形态建成在一定程度上具有器官自主性,可能不受维

管束长距离运输的控制影响。因此,本研究所涉及的 *BdCKX* 基因,极可能是在植物生长中期阶段,大约 40 d 左右,在植物地上部分控制细胞分裂素代谢中起重要作用。由于二穗短柄草基因组编码 10 个同源性各异的 CKX 基因,其它基因可能分别在其它时间和组织器官中发挥作用,对植株整体细胞分裂素的动态平衡起调节作用。更深层次认知二穗短柄草 CKX 的功能,其它同源基因的相关研究需要日后的工作来完善。

超表达 *BdCKX* 基因的植物个体表现出较为弱小的地上部分组织形态,是由于细胞分裂素能够通过参与细胞分裂与分化过程调节植物地上部分的生长发育。而过量的 *BdCKX* 表达产物增强了细胞分裂素的降解,降低了植物体内的细胞分裂素含量,从而弱化了细胞分裂素对地上部分的促进作用。这与拟南芥等植物中的研究发现类似,说明 CKX 基因的作用机制应该在高等植物中是相对比较保守的。同时有分析发现, CKX 基因在早熟禾亚科植物中都比

较保守,且基因序列高度相似。鉴于 *CKX* 基因作用机理保守,可以通过生物技术手段,改造 *CKX* 基因的时空表达模式、表达强度等,达到有效调节麦类作物特定组织的内源性细胞分裂素的分布及含量的目的。通过控制内源细胞分裂素含量从而定向改良植物器官形态和功能,形成发达的根系或提高地上部分生物质量等与产量相关的农艺形状,对于增强植物抗旱能力、促进作物生产具有重要意义。

参考文献:

- [1] Wilhite D A. Drought As A Natural Hazard: Concepts and Definitions [C]//Wilhite D A. Drought, A Global Assessment, Routledge, London; Springer, 2000:3-18.
- [2] 吉庆勋,刘德春,刘 勇.植物表皮蜡质合成和运输途径研究进展[J].中国农学通报,2012,28(3):225-232.
- [3] 倪 郁,郭彦军.植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状[J].遗传,2008,(5):561-567.
- [4] Arulselvi S, Selvi B. Genetic diversity of seedling traits conferring drought tolerance in pearl millet [J]. Madras Agricultural Journal, 2009,96(1-6):40-46.
- [5] 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]. The Plant Cell, 2003,15(11):2532-2550.
- [6] Aloni R, Aloni E, Langhans M, et al. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism[J]. Annals of Botany, 2006,97:883-893.
- [7] Lohar D P, Schaff J E, laskey J G, et al. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and rhizobial symbioses [J]. The Plant Journal, 2004,38(2):203-214.
- [8] Mähönen A E, Bishopp A, Higuchi M, et al. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development[J]. Science, 2006,311(5757):94-98.
- [9] Riefler M, Novak O, Strnad M, et al. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism[J]. The Plant Cell, 2006,18:40-54.
- [10] Brownlee B G, Hall R H, Whitty C D. 3-Methy-1 2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N6-(Δ^2 -isopentenyl) adenine[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1975,53(1):37-41.
- [11] McGaw B A, Horgan R. Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase [J]. Phytochemistry, 1983,22:1103-1105.
- [12] Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I, et al. Root-Specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in arabidopsis and tobacco[J]. The Plant Cell, 2010,22:3905-3920.
- [13] Ashikari M, Sakakibara H, Yamamoto T, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production[J]. Science, 2005,309(5735):741-745.
- [14] Huang S, Cerny R E, Qi Y, et al. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development [J]. Plant Physiology, 2003,131(3):1270-82.
- [15] 余义和,李秀珍,陈迪新,等.“巨峰”葡萄细胞分裂素氧化酶基因 CKX3 的克隆与表达分析[J].园艺学报,2015,42(7):1233-1240.
- [16] 韩惠宾,张国华,王国栋.细胞分裂素参与植物维管系统发育的信号转导研究进展[J].植物生理学报,2015,51(7):996-1002.
- [13] 陆晓民,杨 威.油菜素内酯对氯化钠胁迫下黄瓜幼苗的缓解效应[J].应用生态学报,2013,24(5):1409-1414.
- [14] Zhen A, Bie Z L, Huang Y, et al. Effects of salt-tolerant rootstock grafting on ultrastructure, photosynthetic capacity, and H_2O_2 -scavenging system in chloroplasts of cucumber seedlings under NaCl stress [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011,33:2311-2319.
- [15] 李 悦,陈忠林,王 杰,等.盐胁迫对翅碱蓬生长和渗透调节物质浓度的影响[J].生态学杂志,2011,30(1):72-76.
- [16] 童 辉,孙 锦,郭世荣,等.等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫对黄瓜幼苗生长及渗透调节物质含量的影响[J].西北植物学报,2012,32(2):0306-0311.
- [17] Yuan L Y, Du J, Yuan Y H, et al. Effects of 24-epibrassinolide on ascorbate-glutathione cycle and polyamine levels in cucumber roots under $Ca(NO_3)_2$ stress[J]. Acta Physiol Plant, 2013,35:253-262.
- [18] 王 芳,王丹丹,赵 娟,等.钙对低温胁迫下玉米幼苗氧化损伤的保护作用[J].干旱地区农业研究,2014,32(1):155-160.
- [19] Arora N, Bhardwaj R, Sharma P, et al. Effects of 28-homobrassinolide on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in seedlings of *Zea mays* L. under salinity stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008,30:833-839.
- [20] 常燕虹,武 威,刘建朝,等.干旱胁迫对文冠果树苗某些生理特征的影响[J].干旱地区农业研究,2012,30(1):170-174,203.
- [21] Fariduddin Q, Yusuf M, Chalkoo S, et al. 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress[J]. Photosynthetica, 2011,49:55-64.
- [22] Yuan L Y, Shu S, Sun J, et al. Effects of 24-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. under $Ca(NO_3)_2$ stress[J]. Photosynth Res, 2012,112:205-214.
- [23] Ogwenio J O, Song X S, Shi K, et al. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum* [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2008,27:49-57.
- [24] 唐加红,刘 丹,杨玉兰,等.稀土微肥和 NO 对于旱胁迫下小麦光合生理的影响[J].稀土,2012,33(3):21-25.
- [25] 高青海,王秀峰,史庆华,等.铜对硝酸盐胁迫下黄瓜幼苗生长及叶片抗氧化酶活性的影响[J].应用生态学报,2008,19(5):976-980.
- [26] 张美萍,陕永杰,江玉珍,等.稀土微肥对盐胁迫下黄豆幼苗抗氧化酶的影响[J].稀土,2009,30(3):53-56.

(上接第 173 页)