

苹果腺苷-异戊烯基转移酶基因的组织表达分析

任雪芹¹ 许轲¹ 李皓² 张文¹ 朱元娣^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 国家知识产权局专利局 专利审查协作北京中心, 北京 100010)

摘要 为深入研究 *MdIPTs* 基因在苹果细胞分裂素合成途径中的作用和利用转基因技术改良苹果树型, 分析苹果 (*Malus × Domestica* Borkh.) *A-IPTs* 基因的时空表达, 本研究以‘富士’苹果 (*M. Domestica* Borkh. cv. Fuji) 及其组培苗为试材, 利用半定量 RT-PCR 方法分析 7 个 *A-IPTs* 基因在梢尖、幼叶、茎段节间、皮部组织、叶芽、花芽、花蕾、花、幼果和根部的表达水平。结果表明: *MdIPT3a* 总体表达水平最高、*MdIPT1b* 次之, 在所检测的器官组织中均有表达; *MdIPT5a* 在花蕾和花中表达量高, *MdIPT5b* 在梢尖和幼叶中表达量高; *MdIPT1a* 在根、皮部组织和叶芽中检测到微弱表达, *MdIPT3b* 仅在组培苗的茎段中节间微弱表达; 所检测的组织器官中未检测到 *MdIPT7a* 表达。苹果 7 个 *A-IPTs* 基因具有组织表达特异性, 高度同源的成对基因的组织表达模式不同。

关键词 苹果; 细胞分裂素; 腺苷-异戊烯基转移酶; 半定量 RT-PCR; 表达分析

中图分类号 文章编号 1007-4333(2013)06-0120-06 文献标志码 A

Expression analysis of the adenylylate-isopentenyl transferase (*A-IPT*) genes in apple (*Malus × Domestica* Borkh.)

REN Xue-qin¹, XU Ke¹, LI Hao², ZHANG Wen¹, ZHU Yuan-di^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Patent Examination Cooperation Center of the Patent Office, SIPO, Beijing 100010, China)

Abstract Tissue-specific expression of the *A-IPTs* genes in apple (*Malus × Domestica* Borkh.) were analyzed for further study of roles of *MdIPTs* in cytokinin biosynthesis and modifying tree form by genetic transformation in apple. In this study, the ‘Fuji’ apple (*M. domestica* Borkh. cv. Fuji) and its plantlets in vitro were used as materials and semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to study expression levels of seven *A-IPTs* in shoot tips, young leaves, internodes, bark tissues, leaf buds, flora buds, flowers at balloon stage, open flowers, young fruits and roots of ‘Fuji’ apple. The results showed that *MdIPT3a* and *MdIPT1b* were detected in all tested tissues and organs. The expression lever of *MdIPT3a* was higher than that of *MdIPT1b*. *MdIPT5a* expressed highly in flowers, while *MdIPT5b* in shoot tips and young leaves. The weak expression of *MdIPT1a* was detected in roots, bark tissue, and leaf buds, while *MdIPT3b* was only detected in internodes of plantlets in vitro. *MdIPT7a* wasn't detected in all tested tissues. Seven *A-IPTs* exhibit tissue-specific expression and highly homologous genes in pairs in apple had different expression profiles.

Key words *Malus × Domestica* Borkh.; cytokinins; adenylylate-isopentenyltransferase; semi-quantitative RT-PCR; expression analysis

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070614)

第一作者: 任雪芹, 硕士研究生, E-mail: a2006055001@163.com

通讯作者: 朱元娣, 副教授, 主要从事苹果柱型基因研究, E-mail: zhuyd@cau.edu.cn

植物细胞分裂素(CKs)是一类腺嘌呤 N⁶ 末端被异戊二烯侧链或芳香基侧链取代的化合物,在植物生长发育中具有广泛的功能,如根系扩散、侧枝发生、延迟开花和延缓衰老等^[1]。植物体内 CKs 的生物合成有 2 条途径:从头合成途径和 tRNA 降解途径。异戊烯基转移酶(IPT)是植物细胞分裂素从头合成途径中的第一个限速酶,影响植物内源细胞分裂素种类和水平^[2]。植物中的 IPT 有 2 种类型:一种为腺苷-IPT(A-IPTs),催化合成 CKs 的主要活性形式异戊烯基腺嘌呤(iP)和反式玉米素(tZ);另一种为 tRNA-IPTs,参与催化合成 CKs 的另一活性形式顺式玉米素(cZ)^[2-5]。苹果 A-IPT 基因的鉴定和功能研究有助于增进对细胞分裂素生物合成机制的认识,并有效利用遗传转化技术定向改良苹果树型。编码 IPT 的基因是 1984 年在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中首次鉴定的,命名为 *tmr*,后来称为 *ipt*,属于 A-IPT^[3-4]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[5]、矮牵牛(*Petunia hybrida*)^[6]、啤酒花(*Humulus lupulus*)^[7]、白菜(*Brassica rapa*)^[8]、大豆(*Glycino max*)^[9]、水稻(*Oryza sativa*)^[10]、玉米(*Zea mays*)^[11]、桑树(*Morus alba*)^[12]、平邑甜茶(*Malus hupehensis*)^[13]和‘富士’苹果^[14-15]等植物中相继克隆了 IPT 基因。植物 A-IPTs 基因具有保守结构域 DMAPP-binding 基序(A/G-X₄-GK-S/T)和 VPHHLLG 保守序列,而 tRNA-IPTs 除了这 2 个保守序列以外,一个类似锌指的基序(C-X₂-C-X₁₂₋₁₈-H-X₅-H)^[2,5]。植物 IPTs 属于小基因家族,拟南芥有 9 个 IPT 基因,包括 7 个 A-IPT 和 2 个 tRNA-IPT^[5];水稻含有 10 个 IPT 基因,包括 7 个 A-IPT,2 个 tRNA-IPT 和一个假基因^[10];玉米中克隆了 7 个 IPT 基因,包括 6 个 A-IPT 和一个推测的 tRNA-IPT^[11]。过量表达农杆菌 *ipt* 能够诱导转基因植株内源细胞分裂素水平提高,导致转基因植株的顶端优势消失,并促进侧芽萌发^[16]。过量表达苹果 *MdIPT3a* 和 *MdIPT5a* 的转基因烟草,产生典型的细胞分裂素特异表型,即植物根系发育受到抑制、不定芽增多和开花延迟等^[14-15]。转农杆菌 *ipt* 的苹果产生多枝和矮化的表现型,说明 IPT 基因

对植株形态发育的调控作用和遗传转化 IPT 基因对苹果树型改良的潜在价值^[17]。此外,利用特异表达启动子诱导农杆菌 *ipt* 基因的表达可以延迟开花和延缓植株衰老。特异启动子的应用,使植物 IPT 基因具有广泛的遗传转化应用^[18-19]。目前苹果 IPT 基因家族的研究尚在起始阶段,本课题组从‘富士’苹果中克隆到 7 个 A-IPTs^[14]。这些基因在细胞分裂素合成和苹果生长发育中的作用尚待解析。本研究拟通过半定量 RT-PCR 技术,分析‘富士’苹果不同组织和器官中的 7 个 A-IPTs 的表达特性,旨在为深入研究 *MdIPTs* 在苹果细胞分裂素合成途径中的作用和基因遗传转化提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

试验材料取自田间生长的 10 年生‘富士’苹果树,分别取苹果开花期前后当年生新梢的梢尖、幼叶和皮部组织,一年生枝上未萌动的叶芽和顶花芽,大蕾期的花蕾、已开放的花以及花后 40 d 的幼果。‘富士’苹果组培苗经 90 d 水培后取其梢尖、幼叶、茎段节间(不含腋芽)和幼根。样品采后迅速置于液氮中冷冻,-80 °C 保存备用。

1.2 RNA 提取、纯化及反转录

苹果 RNA 提取采用 SDS 苯酚法^[20]。用不含 RNase 的 DNase I(D2215, TaKaRa, 大连)对提取的 RNA 进行纯化处理后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,微量紫外分光光度计(ND-100, 美国)测定其浓度。将不同组织和器官的 RNA 质量浓度调至相同(500 ng/ μ L),然后用反转录试剂盒(D6130, TaKaRa, 大连)将 RNA 反转录为单链 cDNA,用于半定量 RT-PCR 扩增。使用 2 \times PCR 预混液 *Premix Taq* (R004, TaKaRa, 大连)进行 PCR 扩增。

1.3 半定量 RT-PCR 扩增

1.3.1 引物设计

应用 Primer 5.0 软件设计,引物由上海生物工程技术有限公司合成,引物浓度稀释至 10 mmol/L。引物序列及目的片段长度如表 1 所示。

表1 用于 *MdIPTs* 基因 RT-PCR 扩增的引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-PCR amplification of *MdIPTs*

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer Sequence(5'-3')	目的产物/bp PCR products	基因登录号 Accession No.
<i>MdActin</i>	F:CAATGTGCCTGCCATGTATG R:CCAGCAGCTTCCATTCCAAT	438	AB6386196
<i>MdIPT1a</i>	F:CTCCAATGTCTTCGAACCGGGTTTC R:CCGTCATTTTCCGGCGTCA	480	HQ585951
<i>MdIPT1b</i>	F:GTGCAATGTCTTCGAACCGGGTTCA R:CGCCGTCACATCCGACGATGT	482	HQ585952
<i>MdIPT3b</i>	F:GAATGGATGTGTTCAATCCCCG R:TGTCCACTGCTTGTGTAGTAACCTG	630	HQ585948
<i>MdIPT5a</i>	F:CAACTGAGAAAGAATATACGCGC R:GGTGGTAGTGCGGTGATATT	380	HQ585949
<i>MdIPT5b</i>	F:CTACAAGTGAAGCAGAATATACGAAT R:GGCATAGACGTGGAAAGAATC	402	HQ585950
<i>MdIPT7a</i>	F:ATGAATTCGTCGTCGTGTGCA R:TGAATATCCCATTTGTGCTGAGA	475	HQ585953

1.3.2 内参基因的循环数及模板用量调整

内参基因 *MdActin* 的 PCR 反应系 20 μL 包括稀释 10 倍后的 cDNA 产物 1 μL 、*MdActin* 上下游引物各 0.5 μL 、*Premix Taq* DNA 聚合酶 10 μL 和补 ddH₂O 水至终体积。PCR 反应程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 扩增循环数设置为 23、24、25、26、27、28、29、30、31 和 32。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定 PCR 产物的平台期(28 个循环), 因此循环数定为 27。根据电泳条带亮度调整模板用量, 直至所有模板扩增条带亮度一致, 此时各个模板的用量即为半定量 RT-PCR 的模板用量。

1.3.3 半定量 RT-PCR

分别以‘富士’田间的 8 个组织器官和水培栽培苗的 4 个组织器官的 cDNA 样品(稀释 10 倍)为模板, 选用各自调整好的模板用量, 用 7 对引物进行 PCR 扩增。PCR 体系和 PCR 程序同 *MdActin*, PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外成像仪拍照。

1.4 以苹果基因组 DNA 和蒸馏水为模板的对照 PCR 扩增

为确定 PCR 体系的正确和无污染, 以确保 RT-PCR 结果的准确性。分别以‘富士’苹果的基因组

DNA 和蒸馏水为模板, 用上述 7 对 *A-IPTs* 基因的特异引物进行 PCR 扩增。苹果 DNA 提取采用 CTAB 法^[21]。PCR 反应体系: 模板 DNA (或 ddH₂O) 0.5 μL , 7 对引物各 0.5 μL , *Premix Taq* 10 μL , 补水至终体积为 20 μL 。反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外成像仪拍照。

2 结果与分析

2.1 *MdIPTs* 基因在苹果树不同组织器官中的表达

采用 SDS 苯酚法提取苹果各组织总 RNA, 电泳检测 RNA 的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰明亮和无拖带现象, 且 28S rRNA 的亮度是 18S rRNA 的 2 倍, 表明提取的 RNA 样品较为完整。微量紫外分光光度计测定其浓度约为 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 2.0 以上, 说明样品的纯度较高(图 1)。

利用 *MdActin* 基因引物进行 PCR 以调整 8 个 cDNA 模板至电泳条带的亮度一致后, 用 7 对特异引物对模板 cDNA 进行半定量 RT-PCR。结果表明, *MdIPT1a*、*MdIPT1b*、*MdIPT3a*、*MdIPT3b*、

MdIPT5a、*MdIPT5b* 和 *MdIPT7b* 的循环数分别为 40、36、30、50、36、36 和 50。PCR 扩增达 30 个循环时，在 8 个组织中检测到 *MdIPT3a* 表达，其中皮部组织和叶芽中表达量最高，其次为梢尖、花芽和花。在此循环数下其他基因均未检测到表达。PCR 反应至 36 个循环时，*MdIPT1b* 在 8 个组织中均有表达，花芽的表达量最高、幼果和叶芽次之；*MdIPT5a* 在梢尖、幼叶、花蕾和花中检测到表达，增大 PCR 循环数

至 50 也未检测到其他组织上的表达；*MdIPT5b* 在梢尖和幼叶中表达量最高，在叶芽、花芽和花蕾中少量表达，循环数至 50 个时也未检测到花和幼果的基因表达。PCR 反应至 40 个循环时，*MdIPT1a* 在韧皮部表达量最大，叶芽次之，幼果中极微弱的表达，循环数至 50 时未检测到其他组织上的表达。PCR 反应至 50 个循环时，仍未在任何组织上检测到 *MdIPT3b* 和 *MdIPT7a* 表达(图 1)。

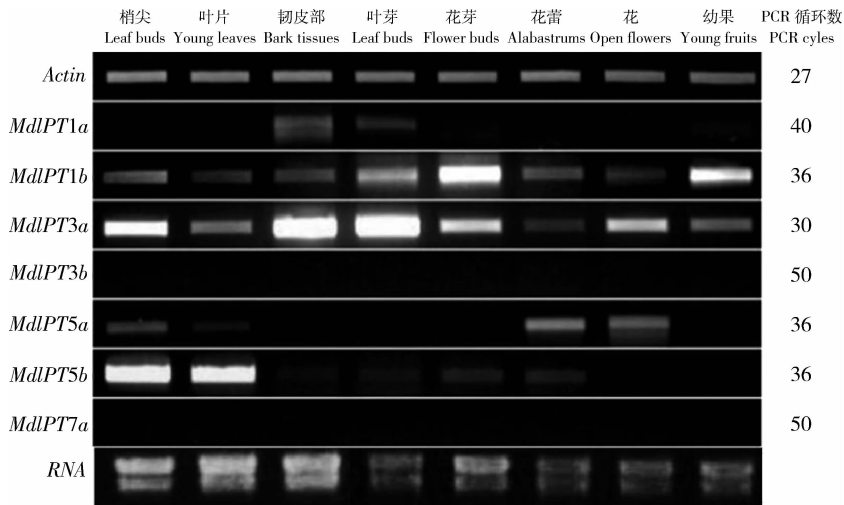


图 1 半定量 RT-PCR 检测 7 个 *MdIPTs* 基因的组织特异性表达

Fig. 1 Tissue specific expression of Seven *MdIPTs* by semi-quantitative RT-PCR

在所检测的苹果树各组织器官中，以 *MdIPT3a* 总体表达水平最高、*MdIPT1b* 次之，在所有的器官组织中均表达。

2.2 *MdIPTs* 基因在苹果组培苗不同组织器官中的表达

以苹果组培苗 4 个组织器官的 cDNA 为模板，利用 *MdActin* 基因的特异引物进行 RT-PCR 扩增，琼脂糖胶电泳检测 PCR 产物条带的亮度，来调整模板 cDNA 用量。利用 7 对特异引物对调整后的模板 cDNA，进行半定量 RT-PCR 扩增。结果表明：PCR 反应至 36 个循环时，*MdIPT5b* 在 4 个检测的组织中均有表达，根和幼叶中表达量最高；*MdIPT5a* 在茎段节间和根中表达量最高，梢尖次之；*MdIPT3a* 在茎段节间表达量最高，梢尖和幼叶中次之，PCR 反应至 50 个循环时，根部检测到微量表达；*MdIPT1b* 在根部表达量最高，茎段节间次之，PCR 反应至 40 个循环时检测到梢尖和幼叶中的基因微量表达。PCR 反应至 40 个循环时，根中 *MdIPT1a* 和节间 *MdIPT3b* 检测到微量表达。

PCR 反应至 50 个循环时，仍未在任何组织上检测到 *MdIPT7a* 表达(图 2)。

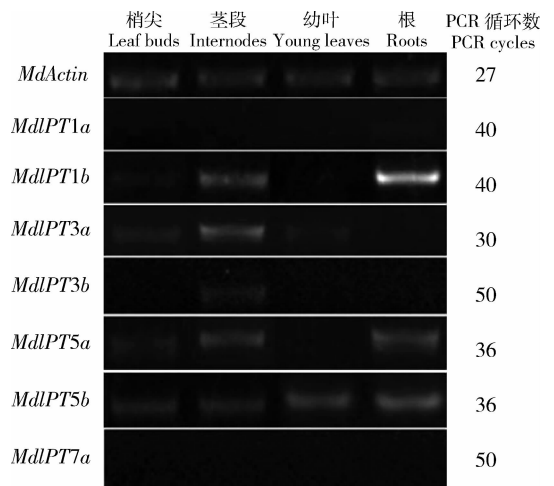


图 2 7 个 *MdIPTs* 基因在苹果组培苗中的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of Seven *MdIPTs* in plantlets in vitro

MdIPTs 基因在‘富士’苹果组培苗的各组织表达与田间苹果树的各组织表达模式一致。

2.3 以基因组 DNA 和蒸馏水为模板的对照 PCR 扩增

分别以‘富士’苹果的基因组 DNA(阳性对照)和蒸馏水(阴性对照)为模板,用 *MdIPTs* 基因的 7 对特异引物进行 PCR 扩增,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。7 个 *MdIPTs* 基因在阳性对照‘富士’苹果基因组 DNA 中均能得到单一目的条带,说明所设计的引物可以对相应基因进行 PCR 扩增。而以蒸馏水为模板的阴性对照中均没有扩增到目的条带,说明反应体系没有被污染,也不会产生非特异性条带(图 3)。

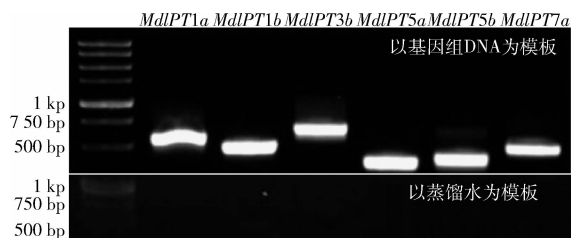


图 3 以苹果基因组 DNA 和蒸馏水为模板的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplifications of apple genomic DNA template and ddH₂O template

3 讨论

随着‘金冠’苹果基因组测序完成,使苹果基因家族的功能分析成为可能^[22]。本课题组根据‘金冠’基因组序列的比对分析,预测了 10 个 *IPT* 基因序列。根据序列设计了特异引物,在‘富士’苹果中克隆了异戊烯基转移酶家族 8 个基因 cDNA 序列,其中 7 个 *A-IPTs* 和 1 个 *tRNA-IPTs* 与预测的相应基因一致,而另外 2 个预测基因克隆的 cDNA 序列与预测结果不一致,仅为基因的部分序列^[14]。苹果 7 个 *A-IPTs* 中有 3 对基因高度同源,其中 *MdIPT3a* 和 *MdIPT3b* 定位于第 3 和第 11 号染色体, *MdIPT1a* 和 *MdIPT1b*、*MdIPT5a* 和 *MdIPT5b* 定位于第 13 和第 16 号染色体。*MdIPT7a* 和 1 个 *tRNA-IPTs* 分别定为在第 16 号和第 3 号染色体上。未克隆到全长的 2 个预测 *IPT* 基因分别定位于第 10 号和 11 号染色体上的^[14]。‘金冠’苹果基因组图谱表明,栽培苹果 (*Malus domestica*) 17 条染色体起缘于 9 条始祖染色体的同缘进化,第 3 和 11 号、第 13 和 16 号染色体分别起缘于同一条始祖染色体。因此,苹果基因家族中有众多成对出现的,相似性极高的非等位基

因,如苹果 SUPERMAN 和 DELLA 蛋白家族具有这个特性^[23-24]。但在拟南芥、水稻和玉米基因组中, *IPT* 基因家族均无成对高度同源的现象^[5,10-11]。

MdIPTs 基因家族的表达具有显著的强度差异和组织特异性(图 1 和 2)。在苹果树各检测的组织器官中, *MdIPT3a* 的整体表达量最高,在全部 8 个组织中均表达,特别是皮部组织和含有韧皮部的叶芽,而且在组培苗的茎段节间表达最强,说明‘富士’苹果地上部分中韧皮部可能是 CKs 合成的主要部位。*MdIPT1b* 的整体表达量次之,在各检测部位具有表达,花芽和幼果为表达量最高的部位。其余基因具有明显的组织特异表达性,如 *MdIPT1a*、*MdIPT3a* 和 *MdIPT5b* 营养器官中表达量较高, *MdIPT1b* 和 *MdIPT5a* 在生殖器官中表达量较高。*MdIPT7a* 在所有部位依然均未检测到表达。拟南芥 *AtIPTs* 基因家族中, *AtIPT1, 3, 5, 7* 作为 4 个主效基因,主要表达部位在根尖木质部形成层、根原基、幼叶、叶腋和韧皮部组织等营养器官,在花粉管和未成熟的花、果实和种子等生殖器官也有一定的表达;而其他非主效基因如 *AtIPT4, 8*, 在营养器官中几乎不表达,仅在未成熟种子的胚乳中高效特异表达^[25]。苹果 *MdIPTs* 基因家族中尚未发现仅在生殖器官中表达的基因。由于根系是 CKs 生物合成的主要场所,‘富士’苹果采用嫁接繁殖本身不具根系,利用‘富士’苹果组培苗检测根系中 *MdIPTs* 基因的表达结果表明, *MdIPT5a/b* 和 *MdIPT1b* 的表述量最高。*MdIPT3a* 和 *MdIPT5a* 的过量表达引起转基因植株体内源细胞分裂素水平提高,植株产生细胞分裂素特异的表型^[14-15]。据此推理,苹果 *MdIPTs* 基因家族中可能的主效基因是 *MdIPT1b/3a* 和 *MdIPT5a/b*, 而 *MdIPT7a* 可能是假基因。

MdIPTs 基因家族中编码区序列高度同源的 3 对基因,每对的 2 个基因表达强度差异显著。*MdIPT1b* 表达显著高于 *MdIPT1a*, *MdIPT3a* 表达最高而 *MdIPT3b* 仅在茎段节间检测到微弱表达, *MdIPT5a/b* 在不同组织的表达显著不同。这一现象暗示了苹果 *MdIPTs* 基因家族中高度同源的基因对之间的功能差异性,可能其中一个执行主要的功能而另一个功能较弱或不具功能。基因的表达强度取决于启动子区域的调控元件,因此,进一步分析基因启动子序列和启动子的功能,可以全面揭示苹果 *MdIPTs* 基因的时空表达特性和植物生长

发育中的作用。

本研究利用半定量 RT-PCR 方法分析了苹果 7 个腺苷-异戊烯基转移酶基因的组织表达特性。*MdIPT3a* 的总体表达水平最高,*MdIPT1b* 次之,各检测组织中具有表达。*MdIPT5a/b* 具有显著的组织特异性,而 *MdIPT1a/3b* 仅在部分营养器官中有微量表达。同源基因对之间具有组织特异表达和基因表达量的差异。

参 考 文 献

- [1] Mok D W S, Mok M C. Cytokinin metabolism and action[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52: 89-118
- [2] Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-kitano M, et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2006, 103: 16598-16603
- [3] Akiyoshi D E, Klee H, Amasino R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81: 5994-5998
- [4] Barry G F, Rogers S G, Fraley R T, et al. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81: 4776-4780
- [5] Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 26405-26410
- [6] Zubko E, Adams C J, Machaekova I, et al. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants [J]. Plant Journal, 2002, 29: 797-808
- [7] Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L) [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 2439-2446
- [8] Ando S, Asano T, Tsushima S, et al. Changes in gene expression of putative isopentenyltransferase during clubroot development in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L) [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2005, 67: 59-67
- [9] 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: 542-550
- [10] Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, et al. Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice [J]. Plant Physiology, 2006, 142: 54-62
- [11] Brugiere 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: 215-229
- [12] Abe I, Tanaka H, Noguchi H. Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 355: 795-800
- [13] Peng J, Peng F T, Zhu C F, et al. Molecular cloning of a putative gene encoding isopentenyltransferase from pingyitiancha (*Malus Hupehensis*) and characterization of its response to nitrate [J]. Tree Physiology, 2008, 28: 899-904
- [14] 李皓, 张文, 赵旭勉, 等. 苹果异戊烯基转移酶基因家族 (*MdIPTs*) 的克隆与 *MdIPT5a* 功能分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44: 4029-4036
- [15] Zhu Y D, Jin Y S, Wei S, et al. Functional analysis of the isopentenyltransferase gene *MdIPT3a* from apple (*Malus pumila* Mill) [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2012, 87(5): 478-484
- [16] Ekloef S, Astot C, Sitbon F, et al. Transgenic tobacco plants co-expressing agrobacterium *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels, but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes [J]. The Plant Journal, 2000, 23: 279-284
- [17] Trifonova A, Savova D, Ivanova K. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivar Granny Smith [J]. Progress in Temperate Fruit Breeding, 1994: 343-347
- [18] Chang H, Jones M L, Banowetz G M, et al. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with *PSAG12-IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene [J]. Plant Physiology, 2003, 132: 2174-2183
- [19] Robson P, Donison S, Wang K, et al. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter [J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2: 101-112
- [20] Verwoerd T C, Dekker B M, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs [J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 2362
- [21] Doyle J J, and Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15
- [22] Velasco R, Zharkikh A, Affoutit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Nature Genetics, 2010, 42: 833-839
- [23] Foster T, Kirk C, Jones W T, et al. Characterisation of the DELLA subfamily in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Tree Genetics and Genomes, 2007, 187-197
- [24] 赵旭勉, 任雪芹, 张文, 等. 苹果 SUPERMAN 类蛋白家族的基因克隆与生物信息学分析 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 7: 782-790
- [25] Miyawaki K, Matsumoto-kitano M, and 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: 128-138