

‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的克隆与表达分析

余义和¹, 李秀珍¹, 陈迪新¹, 李桂荣², 李学强¹, 张国海^{1,*}

(¹河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; ²河南科技学院园艺园林学院, 河南新乡 453003)

摘要: 结合同源克隆和 RACE 技术在 ‘巨峰’ 葡萄 (*Vitis labruscana* Bailey × *V. vinifera* L. ‘Kyoho’) 中克隆了细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3*, 分析了该基因的表达特性及其对细胞分裂素的响应。序列分析表明, 该基因 cDNA 全长为 2 049 bp (GenBank 登录号: KP689597), ORF (开放阅读框) 为 1 569 bp, 编码 522 个氨基酸, 具有 FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸) 结合结构域和细胞分裂素结合结构域。该基因定位在葡萄的 7 号染色体上, 具有 4 个内含子, 5 个外显子。氨基酸序列多重比对和系统进化树分析显示 ‘巨峰’ 葡萄 *CKX3* 与荷花 *NuCKX3* 亲缘关系最近, 与毛果杨同源性较高。基因表达分析结果显示 ‘巨峰’ 葡萄 *CKX3* 主要在根部和花序中大量表达, 其次是在卷须和果实中有较高的表达, 在茎和叶中的表达量较低; 在花序发育过程中, 在盛花期前表达量较低, 盛花期以及盛花后表达量增加。在 6-BA 处理葡萄叶片后, *CKX3* 的表达与细胞分裂素氧化酶的活性都高于对照。

关键词: 葡萄; 细胞分裂素氧化酶; *CKX3*; 表达分析

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 07-1233-08

Isolation and Expression Analysis of Cytokinin Oxidase Gene *CKX3* in Kyoho Grapevine

YU Yi-he¹, LI Xiu-zhen¹, CHEN Di-xin¹, LI Gui-rong², LI Xue-qiang¹, and ZHANG Guo-hai^{1,*}

(¹College of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ²School of Horticulture Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Combined with the homologous clone and RACE technology to clone the cytokinin oxidase gene *CKX3* in Kyoho grapevine, and analyzes the characteristics of the gene expression and its response to cytokinin. Sequence analysis indicated that *CKX3* consisted of 2 049 bp, with ORF of 1 569 bp, encoded 522 amino acids. The deduced amino acids possessed FAD-binding and cytokinin-binding domains. *CKX3* gene is located on chromosome 7 in grapevine, this gene contains 4 introns and 5 exons. Multiple sequence alignments and phylogenetic analysis showed that *CKX3* had the highest evolutionary relationship with *NuCKX3* from *Nelumbo nucifera*, and had the highest homology with *PtCKX3* from *Populus trichocarpa*. The results at transcriptional level indicated that expression of *CKX3* was main in root and inflorescence, the expression in tendril and fruit tissues was higher than that of stem and leaves

收稿日期: 2015-02-09; **修回日期:** 2015-06-11

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14A210018); 河南科技大学博士科研基金项目 (09001765)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guohaizhang@126.com)

tissues. In inflorescence development process, the expression of *CKX3* in blooming before is low, the expression in blooming and blooming later is increased. In the grapevine leaves after 6-BA treatment, the expression of *CKX3* and the cytokinin oxidase enzyme activity were higher than that of control.

Key words: grapevine; cytokinin oxidase; *CKX3*; expression analysis

细胞分裂素在植物生长发育和逆境响应过程中具有重要的作用 (Hwang et al., 2012)。细胞分裂素氧化酶 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX; EC 1.5.99.12) 是促进细胞分裂素降解的一个重要的酶。CKX 最早在玉米中发现, 能特异性地降解细胞分裂素类异戊二烯侧链的不饱和键, 这是一个不可逆的反应 (Hwang et al., 2012)。

研究表明, 在玉米中过量表达细胞分裂素氧化酶基因 *ZmCKX1*, 产生孢子体型雄性不育的表型, 在烟草中过量表达 *ZmCKX1* 同样产生雄性不育的表型, 用外源激动素处理可以恢复雄性不育的育性 (Galuszka et al., 2005)。在拟南芥中异源表达兰花 (*Dendrobium sonia*) *DsCKX1*, 导致内源细胞分裂素含量下降, 并表现出植株矮小, 生物量降低, 根系生长加快, 以及根系和愈伤组织对细胞分裂素的响应降低 (Yang et al., 2003)。拟南芥中有 7 个 *CKX* (*AtCKX1* ~ *AtCKX7*) 基因 (Hwang & Sheen, 2001), 在拟南芥中过量表达 *AtCKX1* 和 *AtCKX2* 导致转基因植株体内的玉米素类和异戊烯基腺嘌呤类细胞分裂素的水平下降到野生型的 30% ~ 45%, 植株表现矮化 (Werner et al., 2001); 过量表达 *AtCKX1* 和 *AtCKX3* 的拟南芥转基因植株开花时间延迟, 花序原基变小, 只能形成极少的花芽, 表明降低内源细胞分裂素的含量将延迟开花时间, 削弱花序分生组织分化花芽的能力 (Werner et al., 2003)。*AtCKXs* 不同成员的空间表达模式也不尽相同。其中, *AtCKX1* 在茎尖和幼花中表达; *AtCKX5* 和 *AtCKX6* 分别在发育中的雄蕊和雌蕊中表达 (Werner et al., 2003)。*Gn1a* 位点是控制水稻每穗结实粒数的主效 QTL, 该位点存在一个细胞分裂素氧化酶基因 *OsCKX2* (Ashikari et al., 2005)。*OsCKX2* 在水稻叶片、茎、花序分生组织和花中表达强烈, 在茎尖中表达较弱, 而在根与胚中不表达 (Ashikari et al., 2005)。*OsCKX2* 的缺失或其功能丧失可提高稻谷的产量 (Ashikari et al., 2005)。小麦 *TaCKX6-D1* 有 5 个单倍体基因型, 其中 *TaCKX6-D1a* 中存在一个 18 bp 的插入突变, 最终导致小麦粒数和产量增加 (Zhang et al., 2012)。番茄 *SICKX3* 的表达与其幼果坐果和初期发育有关。*SICKX3* 在授粉后表达量快速增加, 直至花后 10 d 达到高峰, 随后下降 (Matsuo et al., 2012)。这些研究结果表明细胞分裂素及其氧化酶基因在果实或种子发育中起到了关键作用, 但是细胞分裂素氧化酶基因的作用机制仍不清楚。

细胞分裂素在葡萄的萌芽、花序生长、子房膨大、坐果、果粒大小以及果穗质量、果穗穗形、每穗果粒数、果穗紧密度等方面发挥重要作用 (Srinivasan & Mullins, 1978; 刘广勤 等, 1997; 王央杰 等, 1997, 1998; 哈基姆 等, 1998; Lombard et al., 2006; Zabadal & Bwkoval, 2006; Zepeda et al., 2006)。

为探明细胞分裂素在葡萄生长发育中的作用, 采用同源克隆的方法克隆了葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的片段, 进一步采用 RACE 技术克隆获得 *CKX3* 的全长, 分析了 *CKX3* 在葡萄不同组织以及葡萄坐果与幼果发育初期的表达, 同时检测其对细胞分裂素的表达响应。通过这些研究结果初步揭示 *CKX3* 的表达特性及其在葡萄生长发育中的作用, 为揭示细胞分裂素在葡萄生长发育中的作用机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料及其处理

以生长 8~10 年的篱架栽培 '巨峰' 葡萄 (*Vitis labruscana* Bailey \times *V. vinifera* L. 'Kyoho') 为试验材料。于 2014 年 5 月取根系 (第一新生侧根)、茎 (新展开叶下第 4~5 片叶的茎段)、叶 (新展开叶下第 4~5 片)、花序 (盛花期以及不同发育时期) 和卷须 (新生枝条的第 1 个枝) 等样品, 于果实转色期取果实样品。用 2 mL 无水乙醇完全溶解 6-BA, 配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6-BA。取新稍新展开叶下第 4~5 片叶进行离体培养 (Yu et al., 2013)。6-BA 溶液用微型喷壶喷布离体叶片, 以叶片上能见到明显的水珠为度, 以含无水乙醇 ($2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 的蒸馏水喷布叶片为模拟对照。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 TOP10 购自天根生化科技有限公司 (北京)。克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa (大连)。引物在三博远志生物科技有限公司 (北京) 合成。

1.2 葡萄总 RNA 的提取与反转录

葡萄各组织的 RNA 提取采用天根生化科技有限公司的 plus 植物总 RNA 提取试剂盒 (DP437)。cDNA 第一链的合成参照 PrimeScript^{II} 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 使用说明书。用于 5'RACE 和 3'RACE 的反转录, 参考 Clontech 公司 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。

1.3 基因克隆

以拟南芥 *AtCKX3* 基因序列为靶标, 在 NCBI 的 EST (Expressed Sequence Tag) 核酸库中进行 BLAST, 下载同源性高的 EST 序列进行拼接, 根据拼接的序列设计引物。CKX3-F: 5'-TGATGT ACTGCAAGCTACGCT-3', CKX3-R: 5'-AGTCCTTTTGCTCGAAGATTTA-3'。以 cDNA 合成第一链产物为模板, PCR 反应按照 PrimeSTAR[®] HS (TaKaRa) 说明书进行。克隆获得上述 EST 序列后, 设计引物 CKX3-5'RACE: 5'-GGACCATGGCGGAATGTCTGGCCGC-3' 与 CKX3-3'RACE: 5'-GAGG AACTCCAGGAGCTGCTTAAAGGC-3'。分别以 5'RACE 和 3'RACE 反转录产物为模板, 进行 5'RACE 和 3'RACE PCR 反应, 具体反应程序按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 说明书进行。

PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收后用 pMD19-T (TaKaRa) 试剂盒进行连接, 连接产物经热激转化 TOP10 感受态细胞, 涂布在含有 Amp ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平板上经蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆摇菌, 经菌液 PCR 检测后送样至三博远志生物科技有限公司 (北京) 测序。

1.4 生物信息学分析

测序结果用 NCBI 的 VecScreen 在线软件去除载体序列。'巨峰' 葡萄 CKX3 基因的 ORF (Open Reading Frame, ORF) 用 NCBI 的 ORF Finder 在线软件进行预测。利用 NCBI 数据库的 BLASTn 和 BLASTp 程序对 '巨峰' 葡萄 CKX3 序列及其推导的氨基酸序列进行相似性分析。基因在葡萄染色体上的定位在 <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/> 网站进行。多序列比对分析采用 DNAMAN 软件, 系统进化树用 MEGA6.0 软件构建, 引物设计采用 Primer Premier 5 软件。氨基酸序列的分子量和等电点用 ExPASy 网站的 Compute pI/Mw 程序进行分析, 保守结构域分析采用 ExPASy 网站的 PROSITE 程序和 NCBI 网站的 CD search 程序。

1.5 实时荧光定量分析

提取葡萄不同组织、不同发育时间的花序、以及细胞分裂素处理的叶片的总 RNA，DNase I 消除 DNA 后用随机引物进行反转录。设计实时荧光定量引物为 CKX3-qF: 5'-TTCTCACCTCTGAATACCCG-3'; CKX3-qR: 5'-TTGAGATTGGACAACCTCCTAGCCAT-3'。以葡萄 Ubi 基因 (GenBank 登录号: XM_002273532) 作为内参引物, Ubi-F: 5'-GTGGTATTATTGA GCCATCCTT-3', 5'-AACC TCCAATCCAGTCATCTAC-3'。实时荧光定量 PCR 按照 TaKaRa 公司 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 说明, 在 Bio-Rad IQ5 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上进行 PCR 反应。25 μ L 反应体系: 1 μ L 的反转录模板; 正反向引物各 1 μ L; 12.5 μ L 的 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™]; 9 μ L 的 nuclease-free water。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s; 57 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。55 ~ 95 $^{\circ}$ C, 每 15 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C 做融解曲线。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2011) 法进行分析, 每个处理重复 3 次。

1.6 细胞分裂素氧化酶活性分析

参考 Librerios-Minotta 和 Tipton (1995) 的方法, 取处理不同时间的材料 0.5 g, 加入液氮充分研磨均匀, 加入 4 mL 预冷的提取液 (0.1 mol \cdot mL⁻¹ PBS pH 7.0, 5 mmol \cdot mL⁻¹ β -巯基乙醇, 1 mmol \cdot mL⁻¹ 二硫苏糖醇和 1 mmol \cdot mL⁻¹ 苯甲基磺酰氟), 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 \times g 离心 20 min, 上清液备用。取 2.5 mL 100 mol \cdot mL⁻¹ 磷酸缓冲液 pH 7.0 (10 mmol \cdot mL⁻¹ CuCl₂, 100 mmol \cdot mL⁻¹ 咪唑和 40 μ mol \cdot mL⁻¹ iP) 和 2 mL 上一步的上清液, 反应液在 37 $^{\circ}$ C 下温浴 30 min 后, 用 1.5 mL 40% 的三氯乙酸终止反应, 取 3.5 mL 终止后的反应液, 加入 1 mL 溶于对氨基苯酚 (3% 对氨基苯酚溶于 6% 三氯乙酸) 常温下显色 10 min, 在 352 nm 下测定吸光值。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 ‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的克隆

通过同源克隆获得‘巨峰’葡萄 *CKX3* 的 EST 序列 (图 1, A), 在此基础上通过 RACE PCR 获得 *CKX3* 两端的序列 (图 1, B、C), 拼接后得到全长。该基因的 cDNA 序列全长 2 049 bp (GenBank 登录号: KP689597), 5' 端非编码区长 192 bp, 3' 端非编码区长 288 bp, ORF 1 569 bp。ORF 编码 522 个氨基酸, 理论等电点为 7.68, 分子量为 58.5 kD。保守结构域预测分析发现该蛋白的 5' 端具有一个 FAD 结合结构域, 3' 端具有一个细胞分裂素结合结构域。

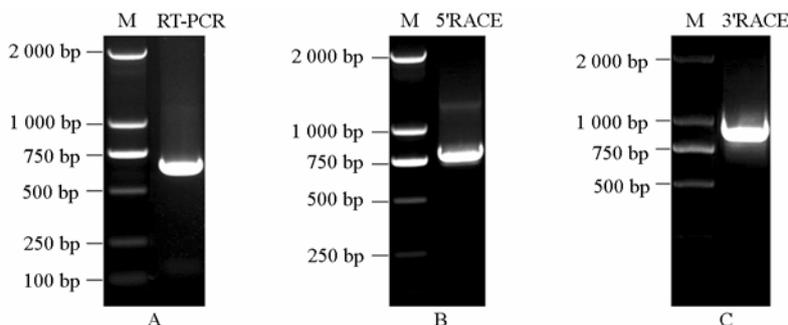


图 1 ‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 克隆的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the cloning of grapevine cytokinin oxidase gene *CKX3*

2.2 ‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的序列分析

染色体定位分析发现‘巨峰’葡萄 *CKX3* 基因定位在 7 号染色体上, 位于 10.7 Mbp 的位置。基因结构分析发现该基因具有 4 个内含子, 5 个外显子。

将‘巨峰’葡萄 *CKX3* 编码的氨基酸序列与相近物种的氨基酸序列进行多序列比对分析, 结果显示其与毛果杨 (XP_002308300) 同源性为 66%; 与番茄 (XP_004251670) 为 63%; 与苹果 (XP_008367923) 为 65%; 与拟南芥 (NP_200507) 为 55%。

为分析‘巨峰’葡萄 *CKX3* 与其他 19 种相近物种同源蛋白的系统进化关系, 用 MEGA6 软件对这些氨基酸序列进行对序列比对, 然后用 Neighbor-Joining 法构建进化树, 结果显示这 20 种 *CKXs* 可以划分为 3 个亚家族, ‘巨峰’葡萄与荷花的亲缘关系最近, 归为 1 个亚家族; 番茄、马铃薯、美花烟草、绒毛烟草以及可可归为 1 个亚家族; 其余的 13 种可以归为 1 个亚家族 (图 2)。

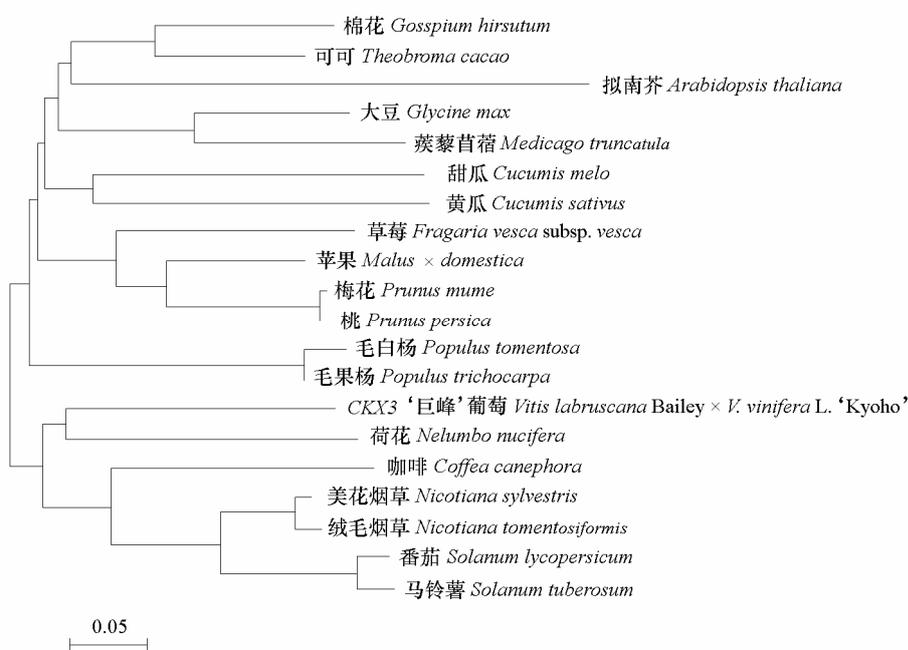


图 2 细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 及其同源基因的进化分析

Fig. 2 Evolution analysis of cytokinin oxidase gene *CKX3* and its homologous

2.3 ‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的表达特性分析

为探讨‘巨峰’葡萄 *CKX3* 基因在不同组织中的表达特性, 除果实外, 其他组织在同一时间取样, 提取总 RNA 后反转录为 cDNA 第一链作为模板进行实时荧光定量 PCR 分析。结果 (图 3) 显示, *CKX3* 主要在根和花序中大量表达, 其次是在卷须和果实中有较高量的表达, 在茎和叶中的表达量相对较低 ($P < 0.05$)。

进一步检测 *CKX3* 在葡萄花序不同发育时间的表达, 结果显示在盛花期的前期表达量较低, 盛花期和盛花后 3 d 表达量急剧增加, 盛花后 6 d 表达量又急剧增加 (图 4)。

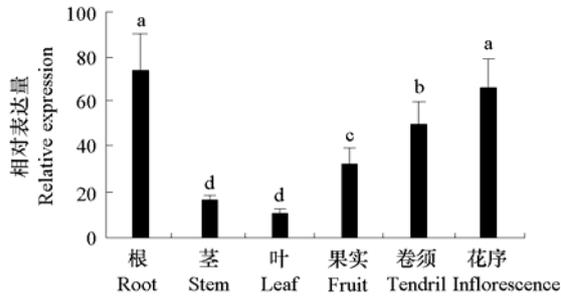


图3 *CKX3* 基因在‘巨峰’葡萄不同组织中的表达分析
Fig. 3 Analysis of the expression of *CKX3* gene in different tissues of grapevine

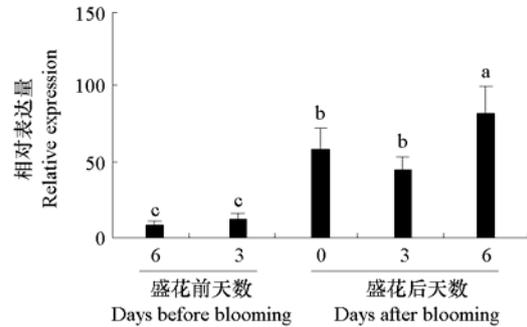


图4 *CKX3* 基因在‘巨峰’葡萄花序不同发育时间的表达分析
Fig. 4 Analysis of the expression of *CKX3* gene in different development time in grapevine inflorescence

2.4 ‘巨峰’葡萄 *CKX3* 基因对细胞分裂素的响应

如图5所示,在6-BA处理‘巨峰’葡萄叶片之前,*CKX3*基因的表达与对照相比没有差异,6-BA处理后表达上调 ($P < 0.05$),处理12 h时表达量达到高峰,随后表达量下降。

进一步检测细胞分裂素氧化酶的酶活性,结果显示在6-BA处理6 h之前细胞分裂素氧化酶活性与对照没有差异,在6-BA处理12 h后酶活性增加 ($P < 0.05$),处理18 h后酶活性达到最高,处理24 h后下降(图6)。

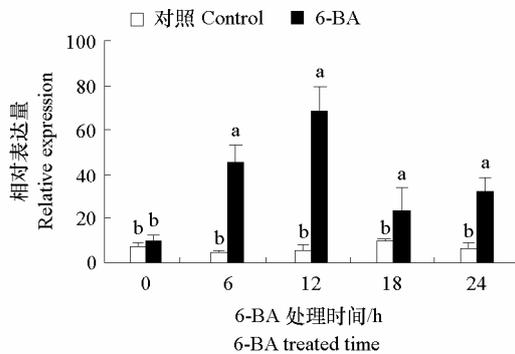


图5 *CKX3* 基因对细胞分裂素 6-BA 的响应
Fig. 5 *CKX3* gene in response to cytokinin

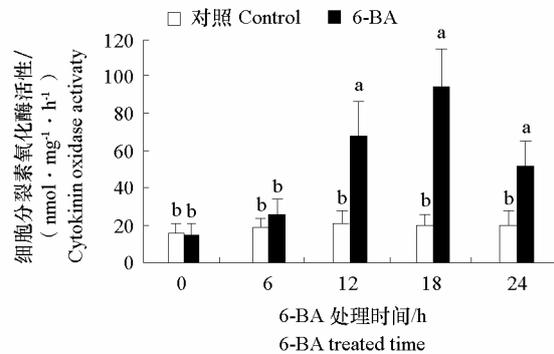


图6 细胞分裂素氧化酶活性对细胞分裂素 6-BA 的响应
Fig. 6 Cytokinin oxidase activity in response to cytokinin

3 讨论

细胞分裂素氧化酶控制着植物体内的细胞分裂素含量,在平衡细胞分裂素的合成与降解中发挥了巨大作用 (Galuszka et al., 2005)。细胞分裂素在葡萄生产实践中应用广泛,但是其作用机制仍不清楚。

CKX3 基因具有细胞分裂素氧化酶基因的典型特征,具有 FAD 结合结构域和细胞分裂素结合结构域。FAD 是核黄素中的黄素腺嘌呤二核苷酸,一般为某些氧化还原酶的辅基,广泛参与体内各种氧化还原反应 (Hwang et al., 2012)。组织表达特性分析结果显示 *CKX3* 主要在根和花序中大量表达,其次是在卷须和果实中有较高量的表达,在茎和叶中的表达量相对较低。在拟南芥中, *AtCKX5*

主要在根部以及雄蕊、花药中大量表达 (Werner et al., 2003); 玉米 *CKX* 主要在根、未成熟和成熟的雄穗、未成熟的雌穗中大量表达 (Werner et al., 2001)。这说明 *CKX* 主要在植物的根和生殖器官中大量表达。已有研究表明细胞分裂素氧化酶在拟南芥根系形态建成中具有重要作用, 过表达 *CKX* 的转基因植株均表现出主根变长, 侧根不定根增长, 根分生组织增大的表型 (Hwang et al., 2012)。近些年越来越多的研究表明细胞分裂素氧化酶在农作物产量形成方面发挥了巨大作用, 其不仅能控制谷粒大小和谷穗分支数, 而且能调节分蘖数和开花习性等 (Ashikari et al., 2005)。由于花序和卷须属于同源器官, 并且 *CKX3* 在葡萄花序和卷须中大量表达。本试验中检测了 *CKX3* 在葡萄花序不同发育阶段中的表达, 结果显示 *CKX3* 基因在盛花期前表达量相对较低, 而在盛花期和盛花期后表达量较高。这可能与细胞分裂素促进葡萄坐果过程有关。

为揭示 *CKX* 对细胞分裂素的响应, 本试验中用细胞分裂素处理葡萄叶片后检测了 *CKX3* 基因的表达。结果显示细胞分裂素处理葡萄叶片后均能促进 *CKX3* 基因的表达, 在处理 12 h 表达量达到高峰; 相对应地细胞分裂素氧化酶活性也高于对照, 在处理 18 h 后出现酶活性的高峰。在大麦中, 用 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 处理叶片能大幅度提高 *CKX* 活性 (Zeng et al., 2012)。在狗蔷薇类根体诱导过程中用不同浓度的 6-BA 处理叶片, *RcCKX5* 的表达量随 6-BA 浓度的增加而不断上升, 在处理 4 h 后迅速升高, 120 h 时最高, 为对照的 15.3 倍 (王玲 等, 2014)。这些研究结果都表明细胞分裂素处理能促进 *CKX* 基因的表达或提高 *CKX* 的酶活性。

References

- Abdul H A, Zhang Shang-long, Chen Da-ming, Chen Lü-rong, Chen Kun-song, Xu Chang-jie, Chen Zhi-hui. 1998. Effects of CPPU, GA₃ treatments on fruit development of Fujiminori grape and the possible mechanisms involved. *Scientia Agricultura Sinica*, 31 (1): 92 - 94. (in Chinese)
- 哈基姆, 张上隆, 陈大明, 陈履荣, 陈昆松, 徐昌杰, 陈志辉. 1998. CPPU、GA₃ 处理对藤稔葡萄生物学性状及其生理基础效应的研究. *中国农业科学*, 31 (1): 92 - 94.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles R, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309 (5735): 741 - 745.
- Galuszka P, Frébortová J, Luhová L, Bilyeu K D, English J T, Frébort I. 2005. Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant and Cell Physiology*, 46 (5): 716 - 728.
- Hwang I, Sheen J. 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 413 (6854): 383 - 389.
- Hwang I, Sheen J, Müller B. 2012. Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 353 - 380.
- Libreros-Minotta C A, Tipton P A. 1995. A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231 (2): 339 - 341.
- Liu Guang-qin, Chang You-hong, Shao Ming-can, Sheng Bao-long, Shu Jia-le, Lin Jing. 1997. Effect of CPPU and GA₃ on fruit set and growth of Kyoho grape. *Journal of Fruit Science*, 14 (4): 257 - 259. (in Chinese)
- 刘广勤, 常有宏, 邵明灿, 盛宝龙, 苏家乐, 蔺 经. 1997. CPPU 和 GA₃ 对巨峰葡萄坐果及果实发育的影响. *果树科学*, 14 (4): 257 - 259.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Lombard P J, Cook N C, Bellstedt D U. 2006. Endogenous cytokinin levels of table grape vines during spring budburst as influenced by hydrogen cyanamide application and pruning. *Scientia Horticulturae*, 109 (1): 92 - 96.
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S. 2012. Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 63 (15): 5569 - 5579.

- Srinivasan, C, Mullins, M G. 1978. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) formation of inflorescences *in vitro* by isolated tendrils. *Plant Physiology*, 61 (1): 127 - 130.
- Wang Ling, Gao Bin, Wen Chao, Xi Lin, Liu Feng-luan, Ma Nan, Zhao Liang-jun. 2014. Isolation and expression analysis of cytokinin dehydrogenase gene *RcCKX5* in *Rosa canina*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (7): 1418 - 1426. (in Chinese)
- 王玲, 高彬, 温超, 郝琳, 刘凤栾, 马男, 赵梁军. 2014. 狗蔷薇细胞分裂素氧化酶基因 *RcCKX5* 的克隆及表达分析. *园艺学报*, 41 (7): 1418 - 1426.
- Wang Yang-jie, Li San-yu, Wang Xiang-yan. 1997. Effect of CPPU on fruit growth and endogenous hormones in Kyoho grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 24 (1): 84 - 86. (in Chinese)
- 王央杰, 李三玉, 王向阳. 1997. CPPU 对巨峰葡萄果粒肥大和内源激素水平的影响. *园艺学报*, 24 (1): 84 - 86.
- Wang Yang-jie, Li San-yu, Wang Xiang-yang. 1998. Mechanism of CPPU on stimulating fruit growth of Kyoho grape. *Bulletin of Science and Technology*, 14 (3): 209 - 212. (in Chinese)
- 王央杰, 李三玉, 王向阳. 1998. CPPU 促进巨峰葡萄果粒肥大的机理研究. *科技通报*, 14 (3): 209 - 212.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (18): 10487 - 10492.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, van Onckelen H, Schmülling 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 (11): 2532 - 2550.
- Yang S H, Yu H, Goh C J. 2003. Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium orchid*. *Plant Molecular Biology*, 51 (2): 237 - 248.
- Yu Y, Xu W, Wang J, Wang L, Yao W, Yang Y, Xu Y, Ma F, Du Y, Wang Y. 2013. The Chinese wild grapevine (*Vitis pseudoreticulata*) E3 ubiquitin ligase Erysiphe necator-induced RING finger protein 1 (EIRP1) activates plant defense responses by inducing proteolysis of the VpWRKY11 transcription factor. *New Phytologist*, 200 (3): 834 - 846.
- Zabadal T J, Bukovac M J. 2006. Effect of CPPU on fruit development of selected seedless and seeded grape cultivars. *HortScience*, 41 (1): 154 - 157.
- Zeng Q W, Qin S, Song S Q, Zhang M, Xiao Y H, Luo M, Hou L, Pei Y. 2012. Molecular cloning and characterization of a cytokinin dehydrogenase gene from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 30 (1): 1 - 9.
- Zepeda M, Fernandez M A, Vidal-Lezama E, Holguin R, Hiaz D H. 2006. Effects of the application of cytokinin bioregulators on inflorescence development of table grapes. *Acta Hort*, 727: 295 - 298.
- Zhang L, Zhao Y L, Gao L F, Zhao G Y, Zhou R H, Zhang B S, Jia J Z. 2012. *TaCKX6-D1*, the ortholog of rice *OsCKX2*, is associated with grain weight in hexaploid wheat. *New Phytologist*, 195 (3): 574 - 584.