

杨树 *PtRRI* 基因的组织特异性表达模式分析

章晶晶, 郭英华, 赵树堂, 卢孟柱*

(林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 模式植物在木本植物中鉴定的许多重要调控因子家族在木本植物中出现了基因家族成员扩张, 但 ARR 家族作为细胞分裂素响应调节因子在杨树基因组中成员数量反而减少, 其在木本植物中如何行使功能需要进一步研究。[方法] 本研究通过生物信息学构建 *PtRRI* 启动子与 *GUS* 融合表达载体, 检测植物激素处理后 *PtRRI* 表达量和检测 $P_{PtRRI}::GUS$ 转基因植株在生根过程中 *GUS* 信号等方法, 对杨树 *PtRRI* 基因的组织特异性表达模式进行分析。[结果] 表明: *PtRRI* 在杨树根部、形成层、木质部表达量相对较高, *PtRRI* 转录受 6-BA 激素诱导, 与其在不定根发育过程中激素调控下的表达相一致。[结论] *PtRRI* 基因可能参与杨树的次级生长。

关键词: 84k 杨树; *PtRRI*; 启动子; 表达分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)02-0034-07

Analysis of Tissue-specific Expression of Poplar *PtRRI* Gene

ZHANG Jing-jing, GUO Ying-hua, ZHAO Shu-tang, LU Meng-zhu

(State Key Laboratory of Tree Genetic and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] Many genes coding for important regulatory factors in model plant appears amplified numbers in woody plants. It is worth to be further investigated that the Class A ARR gene family, as a kind of cytokinin responsive factor, reduces its number in *Populus*. [Method] Based on the method of bioinformatics, the expression pattern of family members was analyzed by RNA-seq and semi-quantitative PCR, building *PtRRI* fused to *GUS* expression vector, Detecting the *PtRRI* expression in *Populus alba* × *P. glandulosa* clone after treated with 6-BA, GA₃, ABA and IBA hormones and the GUS signals of $P_{PtRRI}::GUS$ transgenic plant in the process of rooting. [Result] The GUS signal in $P_{PtRRI}::GUS$ transgenic plants indicated that the *PtRRI* was mainly expressed in roots, cambium, xylem and this gene may involve in the secondary growth and the expression pattern during adventitious root formation. In addition, the *PtRRI* transcription expression was induced by 6-BA, which was consistent with its expression under hormone regulation during adventitious root development. [Conclusion] The results of this study suggest that *PtRRs* may involve in the process of secondary growth and development of *Populus*.

Keywords: *Populus alba* × *P. glandulosa*; *PtRRI*; promoter; expression analysis

植物激素中的细胞分裂素,影响着植物生长发育的不同过程,细胞分裂素信号转导系统是行使其功能的关键成分^[1]。细胞分裂素信号系统,主要包

括三个关键因子,跨膜的受体组氨酸激酶(HKs)、酸基团转移蛋白(HPs)和细胞核内的响应调节因子(RRs)^[2]。根据氨基酸保守序列和能否被细胞分裂

收稿日期: 2017-03-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)“形成层干细胞维持、分化以及次生木质部发育的调控机制”(2012CB114500)

作者简介: 章晶晶(1990—),男,硕士研究生. 主要方向: 林木极性生长调控. E-mail: 18001162535@163.com

* 通讯作者: 卢孟柱,研究员,博士生导师,从事分子生物学研究. E-mail: lumz@caf.ac.cn

素诱导,拟南芥响应调节因子(*ARR*)基因家族被分为A类、B类和APRR,其中,A类在拟南芥中存在10个成员^[3],为数众多的家族成员表明它们在细胞分裂素调节许多生物学过程中具有重要作用。拟南芥中A类*ARR*基因家族蛋白主要功能是作为负反馈调节细胞分裂素信号,抑制B类*ARR*家族活性。B类*ARR*是一类植物特异转录因子,在拟南芥中B类*ARR*家族成员功能冗余^[4-7]。拟南芥APRRs蛋白氨基酸序列中的天冬氨酸位点缺失,APRR家族成员对昼夜节律具有重要调节作用,在对昼夜节律的调节方面不同成员显示不同的调控方式^[8]。

A类*ARR*的表达影响根顶端分生组织的发生,在拟南芥根部发育过程中,细胞分裂素的缺失会影响分生组织的大小和活动^[9]。A类*ARR*在生长素和细胞分裂素对根部发育共同调控中起到节点的作用,一方面,A类*ARR7*和*ARR15*的表达受生长素的调控,通过抑制细胞分裂素在未分化的干细胞中的积累,从而保持干细胞特征;另一方面,A类*ARR*成员中的*ARR5*、*ARR6*、*ARR7*和*ARR15*能被植物干细胞决定基因(*WUS*)直接抑制表达,降低对细胞分裂素信号的负反馈作用,从而上调细胞分裂素的作用,促进细胞分化^[10]。

*ARR*家族作为细胞分裂素响应调节因子,对拟南芥的生长发育起到重要作用;然而,在杨树中,许多重要调控因子家族出现了扩张,杨树*RRs*家族功能的研究有待进一步深入。目前,杨树*RRs*家族已确定了33个*RRs*成员^[11]。其中,B类*PtRRI3*是抑制不定根形成的下游转录因子,在杨树根系发育过程中起着重要作用^[12],但对杨树A类*RRs*基因家族研究还鲜见报道。本研究发现,A类*ARR*家族在根发育过程中有较高的表达。结合转录组数据,筛选出在根中表达丰度最高的*PtRRI*加以研究。通过定

量表达分析和转基因技术、激素处理等对*PtRRI*基因的表达模式进行了初步探究,旨在为研究该基因在杨树生长发育过程中的功能机制提供基础,为进一步解析杨树A类*RRs*基因的功能奠定基础。

1 材料

材料为银腺杨无性系84K(*Populus alba* × *P. glandulosa*)组培苗,培养温度为(25 + 1)℃,光照为16/8 h(白天/黑夜),光照强度为50 μmol · L⁻¹ · m⁻² · s⁻¹,实验操作在林木遗传育种国家重点实验室中进行。

1.1 序列分析

用拟南芥A类*ARR*的蛋白序列在毛果杨基因组数据库(<http://www.phytozome.net/poplar.php>)中进行Blastp比对分析,用Clustal X2.0对拟南芥A类*ARR*和杨树A类*PtRR*蛋白全长进行序列多重比对分析^[13]。采用MEGA 4.0软件的邻结法(NJ)构建进化树^[14]。利用在线软件MEME(<http://meme-suite.org/>)分析A类*PtRR*保守结构域。

1.2 *PtRRI* 基因表达分析

半定量PCR及克隆*PtRRI*启动子的引物使用Primer3软件(<http://primer3.ut.ee/>)设计,引物见表1。使用RNeasy Plant Mini试剂盒和RNase-free DNase I试剂盒分别提取毛果杨根、茎、叶、形成层、未成熟木质部总RNA。每个样品取大约1.5 μg RNA使用Superscript III First-strand Kit试剂盒反转录合成cDNA的第一链。杨树*PtActin*作为内参基因(基因序列号:EF418792.1),每个cDNA为模板进行半定量PCR,扩增产物使用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。所有试验分别进行3次生物学重复与技术重复。

表1 基因、启动子和实时定量PCR分析所用的引物
Table 1 Primer sequences for amplification of *PtRR*, promoters and qPCR

| 引物 | 序列(5'-3') | 用途 |
|-------------------|------------------------------------|--------------------|
| <i>PtRRI-F</i> | 5'-CACTCATCTCCTCACCGTGTGTTAGT-3' | 半定量 RT-PCR 引物 |
| <i>PtRRI-R</i> | 5'-CAACGCTATCAATCACACTACTACCACG-3' | |
| <i>PtActin-F</i> | 5'-GATGACCCAGATCATGTTTG-3' | 半定量 RT-PCR 内参基因引物 |
| <i>PtActin-R</i> | 5'-TCCTTGCTCATCCTGTCAG-3' | |
| <i>ProPtRRI-F</i> | 5'-AGGAATGGGTAGGAGAAAGATG-3' | <i>PtRRI</i> 启动子引物 |
| <i>ProPtRRI-R</i> | 5'-TACAATTCCACTAACGATGTGTC-3' | |

1.3 *PtRRI* 启动子克隆及载体的构建

选取 *PtRRI* 基因上游 2 200 bp 的启动子区域,以毛果杨基因组 DNA 为模板,琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增产物克隆至中间载体 pDNOR222.1,测序正确后克隆至 pMDC164,构建 $P_{PtRRI}::GUS$ 载体。载体构建采用 gateway 克隆系统(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),具体操作按产品说明书进行。

1.4 遗传转化

由于银腺杨无性系 84K 易于进行遗传操作,故选择其进行基因转化。在 $P_{PtRRI}::GUS$ 的农杆菌 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$ 时侵染银腺杨 84K 叶盘。感染后的叶盘在不定芽诱导培养基上,在温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的黑暗条件下共培养 3 天。共培养后的叶盘转移至 SIM 培养基上,诱导和筛选抗性不定芽。经过约 25 天的诱导培养,将抗性不定芽转移至生根培养基中,直至诱导出不定根^[15]。 $promoter::GUS$ 分析至少采用 3 个转基因株系。

1.5 *GUS* 基因表达的组织化学检测

GUS 的组织化学染色按照如下步骤进行:2 周的幼苗和 4 周的茎段在 90% 预冷丙酮中固定 30 min,固定后的组织材料使用 *GUS* 染色缓冲液在冰上洗涤 3 次,再转移至 *GUS* 染色液中,真空抽气后在 37°C , $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 温浴 12 h 密封存放后使用 75% 乙醇脱色^[16]。每一个 $promoter::GUS$ 转基因株系至少有 5 个克隆进行 *GUS* 染色,每个实验至少重复 3 次,通过实体显微镜观察根部染色和震荡切片观察茎部 *GUS* 表达情况。

1.6 激素处理下 *PtRRI* 表达分析

选取 20 天生长状态一致的银腺杨 84K 组培苗 15 棵,在 1/2MS 溶液炼苗 1 周后,各取 3 棵分别用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 溶液和 1/2M 溶液处理 2.5 h,分别混合研磨样品提取 RNA,反转录后通过荧光定量 PCR,检测 *PtRRI* 在 4 种激素处理下表达量的变化,上述实验重复 3 次。

1.7 *PtRRI* 基因在不定根形成过程中的动态变化

在生根培养基内,对生长状态一致的 $P_{PtRRI}::GUS$ 组培苗茎段进行扦插,分别对扦插后第 1、3、5、7、9 天的茎段取样,进行 *GUS* 染色,观察拍照。

2 结果与分析

2.1 *PtRRI* 系统进化

PtRRI 在系统进化上属于 A 类 *PtRR* 家族成员,通过 A 类 *PtRR* 蛋白质序列与已报道的拟南芥 A 类 ARR 蛋白进行多重比对,采用 MEGA 4.0 中 NJ 法构建系统进化发生树,根据与拟南芥的对应关系命名,没有对应拟南芥的 *PtRR* 用罗马符号表示(图 1)。由图 1 可以看出:拟南芥中 ARR 家族与杨树 *PtRR* 家族对应关系不强,ARR3 和 ARR4 对应的杨树同源家族 *PtRR3/4a* 和 *PtRR3/4b*,ARR5 和 ARR6 没有对应的杨树同源家族,ARR8 和 ARR9 对应的杨树同源家族 *PtRR8/9a* 和 *PtRR8/9b*,ARR16 和 ARR17 对应的杨树同源家族只有 *PtRR16/17*,ARR7 和 ARR15 对应的杨树同源家族也只有 *PtRR7/15*,剩下的没有对应拟南芥 ARR 的杨树 *PtRR* 分别定名为 *PtRRI*、*PtRR II*、*PtRR III*。对杨树 A 类 RR_s 家族氨基酸序列分析,表明 A 类 *PtRR* 蛋白都具有 RR_s 家族典型的 D-D-K(由三部分组成,分别是天冬氨酸、天冬氨酸、赖氨酸的蛋白结构)结构域^[3](图 2)。

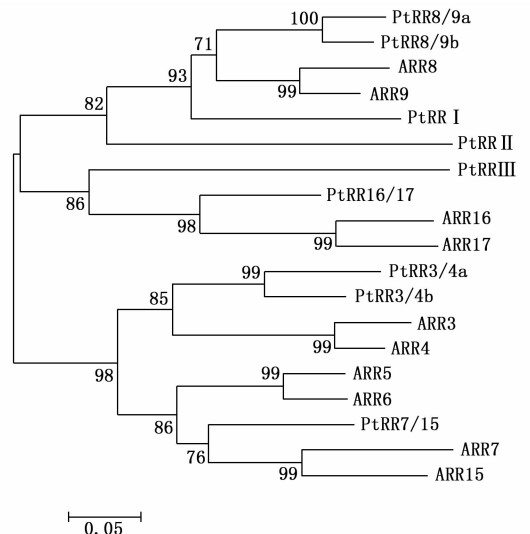


图 1 A 类 ARR 与 A 类 *PtRR* 家族蛋白的系统进化树

Fig. 1 phylogenetic tree of *Arabidopsis thaliana* class A ARR and poplar class A *PtRR* gene family protein.

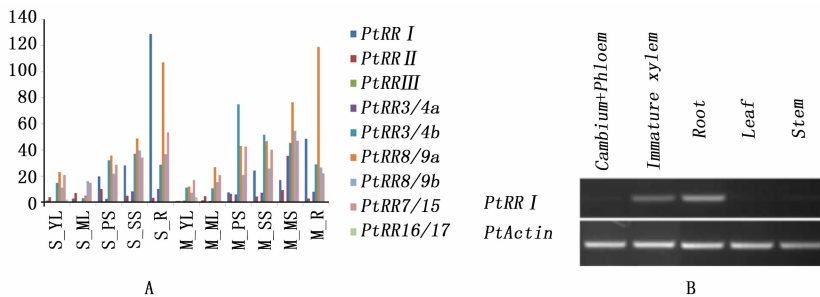
2.2 *PtRR I* 组织表达模式

为了检测 *PtRRI* 基因在杨树发育上的作用,分析了 A 类 *PtRR* 基因在银腺杨无性系 84K 的两



图2 A类PtRR家族蛋白保守结构域

Fig. 2 Poplar class A PtRR protein conservative structure



A: 杨树 A 类 *RRs* 基因在不同营养组织中表达柱状(S_YL, 幼苗的幼嫩叶片; S_ML, 幼苗的成熟叶片; S_PS, 幼苗的初生茎; S_SS, 幼苗的次生茎; S_R, 幼苗的根; M_YL, 成熟植株的幼嫩叶片; M_ML, 成熟植株的成熟叶片; M_PS, 成熟植株的初生茎; M_SS, 成熟植株的次生茎; M_R, 成熟植株的根。

B: *PtRRI* 基因在毛白杨根、叶、茎、形成层区域和未成熟木质部的表达模式

A: Histogram of *PtRRI* genes expressed in vegetative tissues (S_YL, seedlings of young leaf; S_ML, seedling leaves; Orphaned S_PS, seedling stem; S_SS, seedlings of secondary stems; S_R, seedling roots, M_YL, mature of young leaves; M_ML, mature mature leaves; Orphaned M_PS, mature plant stems; M_SS, mature plant secondary stems; M_R, mature plant roots).

B: Semi-quantitative *PtRRI* gene expression analysis. *PtRRI* genes the expression pattern of root, leaf, stem, cambium zone and immature xylem

图3 A类 *PtRR* 在杨树不同组织中的表达模式Fig. 3 Expression analysis of class A *PtRR* in different tissues of poplar

2.3 *PtRRI* 启动子驱动 *GUS* 基因在杨树中的表达

为了深入研究 *PtRRI* 的表达模式,对其启动子驱动的 *GUS* 转基因植株进行了染色分析,图 4A 显示:*PtRRI* 主要在根里表达,并且集中在根尖分生区和维管束中(图 4D、E)。另外,在 $P_{PtRRI}::GUS$ 转基因杨树幼苗茎段也有 *GUS* 着色,主要集中在叶腋分生区(图 4B),对其进行解剖分析发现,*GUS* 着色主要集中在形成层区域(图 4C),表明 *PtRRI* 可能与杨树维管系统发育密切相关。

2.4 *PtRRI* 对不同激素的响应

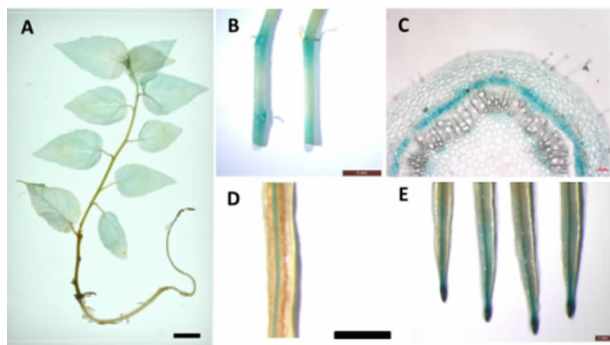
PtRRI 作为细胞分裂素响应调节因子,可能参与了激素对植物生长发育的调控。用 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃、 1

个时期(幼苗期和成熟植株)不同营养组织中的转录组数据,由图 3A 可以看出:A 类 *PtRR* 基因各成员之间在杨树 2 个生长发育时期的不同组织中表达量存在较大差异,同一个基因在不同发育时期和组织中的表达也存在较大差异。相对于杨树 *RRs* 家族其他成员,*PtRRI* 在根部和木质部中表达量较高。用半定量 PCR 的方法验证毛白杨 *PtRRI* 基因的表达模式,结果与转录组数据一致(图 3B),从图中可以看出:*PtRRI* 基因主要在根和木质部组织中表达,表明 *PtRRI* 可能参与了杨树木质部的发育过程。

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 处理 2.5 h 后提取 RNA,反转录后通过荧光定量 PCR 检测,结果(图 5)显示:6-BA 处理下 *PtRRI* 表达量升高,GA₃ 处理下 *PtRRI* 表达量略微升高,GA₃ 处理下 *PtRRI* 表达量变化不显著,而 IBA 处理下 *PtRRI* 表达量略微下降,表明 *PtRRI* 基因受 6-BA 的调控,这与 *PtRRI* 作为细胞分裂素负反馈调节因子的理论一致。

2.5 *PtRRI* 基因在不定根形成过程中的动态变化

不定根形成过程中需要生长素和细胞分裂素共同作用,*PtRRI* 可能参与这个过程。因为 promoter::*GUS* 能很好地解析基因转录的动态变化,所以,对 $P_{PtRRI}::GUS$ 转基因植株进一步观察 *PtRRI* 在生根过程中的动态变化。在生根培养基内扦插后第 1 天的



A、B、C、D、E 的比例尺分别为 10 mm、5 mm、50 μm 、1 mm、1 mm。
The bar represents 1 cm in A, 5 mm in B, 50 μm in C, 1 mm in D,
1 mm in E.

图 4 *PtRR1* 启动子的 GUS 染色分析

Fig. 4 GUS staining analysis of the *PtRR1* promoter

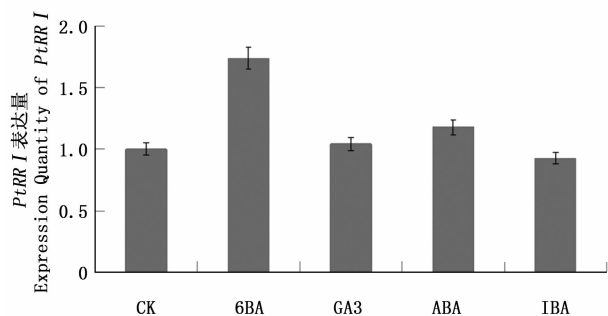


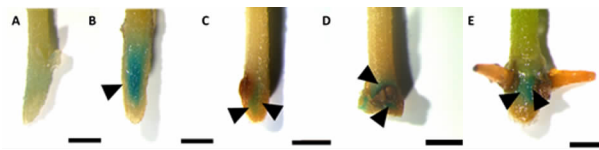
图 5 激素处理下 *PtRR1* 表达反应

Fig. 5 Hormone treatment *PtRR1* express response.

茎段切口处出现微弱的 GUS 信号(图 6A),第 3 天可以观察到 GUS 信号在切口处表达加强,集聚到根原基部位(图 6B),第 5 天 GUS 信号出现在愈伤基部(图 6c),第 7 天 GUS 信号在愈伤基部表达加强(图 6D),在扦插后第 9 天 GUS 信号在根基部较强,且集中在新生根根尖(图 6E)。实验过程表明:在不定根再生过程中,*PtRR1* 主要在愈伤组织和根原基周边表达,生根后则在不定根的根尖,表明 *PtRR1* 可能参与了根部发育过程中的根源基的维持和愈伤组织的形成。

3 讨论

本研究在杨树最新基因组数据库中,利用拟南芥 *ARRs* 氨基酸序列 Blastp 进行搜索比对后,确定了 9 个杨树 A 类 *RRs* 基因家族成员。根据与拟南芥的对应关系命名,与以往的命名不同^[11],分析蛋白保守结构域显示,*PtRR* 家族氨基酸序列都具有典型的 D-D-K 结构域,它是证明蛋白属于 *RRs* 家族的主



注:*PtRR1*::GUS 组培苗在生根过程中的 GUS 表达模式变化,分别取样于扦插后第 1 天(A),第 3 天(B),第 5 天(C),第 7 天(D),第 9 天(E)。箭头指示 GUS 信号。比例尺代为表 1 mm。

Note: *PtRR1*::GUS somaclone in the process of rooting GUS expression pattern change, sampling respectively in cuttings on the first day (A), (B) on the third day, on the five day (C), and on the seventh day (D), on the nine day (E)

图 6 *PtRR1*::GUS 转基因组培苗在扦插生根不同时期的 GUS 染色

Fig. 6 The GUS expression in the process of cuttings rooting.

要依据^[3],也表明了 *RRs* 家族成员虽然变异较大,但结构域非常保守,推测杨树的 *RRs* 家族与拟南芥相应家族有类似的功能。

通过不同组织中 A 类 *PtRR* 的转录组数据,分析了基因家族的表达模式。依据转录组数据筛选出在根部表达最强的 *PtRR1*,*PtRR1* 在系统进化上没有相对应的拟南芥 *ARR* 基因,其功能有待探究。通过构建 *PtRR1* 启动子 GUS 融合表达载体进一步研究 *PtRR1* 的组织表达模式,在转基因植株中 GUS 染色显示,*PtRR1* 基因主要在杨树的根部和维管组织中表达,表明 *PtRR1* 可能参与了不定根和维管组织的发育。在拟南芥根部发育过程中,早已经明确了 *ARR* 基因家族的重要作用,与 *PtRR1* 在系统进化上最近的 *ARR8* 和 *ARR9* 的研究表明,其超表达植株对主根的生长作用很小,但是增加了侧根的数目;其它家族 *ARR* 成员超表达研究中,发现 *ARR3*、*ARR4*、*ARR5*、*ARR16* 和 *ARR17* 对主根生长起到重要促进作用,其中 *ARR3*、*ARR6*、*ARR15*、*ARR16* 和 *ARR17* 对侧根数目增加也起到重要作用^[17]。在水稻中,也确定了细胞分裂素响应调节因子 A 类 *OsRR2* 基因和 *OsRR1* 基因对根系发育的重要作用^[18-19],其中,*OsRR2* 的表达受 *OsWOX11* 基因直接抑制,超表达 *OsWOX11* 基因的水稻表现为不定根生长的提前和数目的显著增多,*OsWOX11* 基因突变后的水稻表现为不定根生长速度减缓和数目明显减少,*OsRR2* 都直接参与 *OsWOX11* 基因调节不定根发育这些过程^[18]; *OsRR1* 基因的表达直接受 P2/ERF 转录因子的 *CLR5* 蛋白调控,通过抑制细胞分裂素的信号转导,对不定根的发生起到促进作用^[19]。这些结果也说明,不同物种的不同成员对根的发育具有不同的作用。

本研究根据对 *PtRR1* 启动子序列分析发现,启动子内含有为数众多的激素响应元件,推测 *PtRR1* 在根系发育过程中的作用可能与激素之间相互调节有关。不同激素处理对 *PtRR1* 转录的影响呈现差异进一步表明 *PtRR1* 基因功能可能参与了杨树根部发育过程中激素之间的相互作用,其中,细胞分裂素处理下的 *PtRR1* 转录水平提高,生长素处理下的 *PtRR1* 转录水平下降,正好符合 A 类 *RRs* 家族作为细胞分裂素负反馈调节因子这一特性。研究发现,在生长素和细胞分裂素相互作用来调控根部发育的过程,在根原基细胞中,受生长素调控的 *ARR5* 和 *ARR7* 对细胞分裂素具有负反馈调节作用,并且 *ARR7* 和 *ARR15* 只能表达在根源基的早期细胞中,依赖于 A 类 *ARR* 基因的这种时空表达模式,改变了不同阶段和部位细胞分裂素的浓度,从而对根部分生组织形态的维持起到重要作用^[20-21]。进一步利用 *PtRR1* 启动子驱动的 *GUS* 基因的动态表达,发现 *PtRR1* 参与杨树不定根形成的具体过程,显示出在根源基形成时期表达升高,此时生长素作用减少,促进愈伤组织的形成;但分生组织分化时生长素上升^[22],*PtRR1* 表达减少,整个过程也与激素处理结果一致。

4 结论

本研究鉴定确定了 9 个杨树 A 类 *RRs* 基因家族成员,根据与拟南芥的对应关系进行了新的命名,比以往的命名更加体现了与拟南芥 *ARR* 基因家族的系统进化关系,同时也为不同物种间相关成员功能研究提供了便利。组织表达分析发现,*PtRR1* 在杨树根、叶和形成层呈现高表达,构建 *PtRR1* 启动子 *GUS* 融合表达进一步明确了 *PtRR1* 基因的表达模式,分析了 *PtRR1* 基因在生根过程中的表达水平,*PtRR1* 转录受 6-BA 诱导,表明 *PtRR1* 可能参与了杨树根系发育过程。随着 *ARR* 基因家族在拟南芥中的功能深入研究,杨树作为世界上重要的林木和多年生模式植物,*PtRR* 家族的功能有待进一步探究。研究杨树 *RRs* 家族功能以及 *PtRR1* 在杨树细胞分裂素信号转导途径中的作用和分子机制,对指导杨树分子育种,具有重要的科学理论和生产实践意义。

参考文献:

[1] 罗超,黄世文,王茜,等. 细胞分裂素的生物合成、受体和信号转导的研究进展[J]. 特产研究, 2011, 33(2): 71-75.
[2] Ferreira F J, Kieber J J. Cytokinin signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(5): 518-525.

[3] Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 605-627.
[4] To J P, Haberer G, Ferreira F J, et al. Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling[J]. The Plant Cell, 2004, 16(3): 658-671.
[5] Ishida K, Yamashino T, Mizuno T. Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene *ARR9* is regulated by the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(11): 3025-3029.
[6] Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, et al. Three Type-B Response Regulators, *ARR1*, *ARR10* and *ARR12*, Play Essential but Redundant Roles in Cytokinin Signal Transduction Throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiology, 2008, (49): 47-57.
[7] Mason M G, Mathews D E, Argyros D A, et al. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2005, 17(11): 3007-3018.
[8] McClung C R. Plant circadian rhythms[J]. The Plant Cell, 2006, 18(4): 792-803.
[9] Werner T, Motyka V, Strnad M, et al. Regulation of plant growth by cytokinin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(18): 10487-10492.
[10] Leibfried A, To J P, Busch W, et al. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators[J]. Nature, 2005, 438(7071): 1172-1175.
[11] Ramírez-Carvajal G A, Morse A M, Davis J M. Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development[J]. New Phytologist, 2008, 177: 77-89.
[12] Ramírez-Carvajal G A, Morse A M, Dervinis C, et al. The Cytokinin Type-B Response Regulator *PtRR13* Is a Negative Regulator of Adventitious Root Development in *Populus*[J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 759-771.
[13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876-4882.
[14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(24): 1596-1599.
[15] 舒文波,赵树堂,章晶晶,等. 超量表达 *FBL1* 对 84K 杨根系和生长量影响研究[J]. 林业科学研究, 2015, 28(6): 871-876
[16] Shu W, Liu Y, Guo Y, et al. A *Populus* TIR1 gene family survey reveals differential expression patterns and responses to 1-naphthaleneacetic acid and stress treatments[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 719.
[17] Ren B, Liang Y, Deng Y, et al. Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling[J]. Cell Research, 2009, 19(10): 1178-1190.
[18] Zhao Y, Hu Y, Dai M, et al. The Wuschel-related homeobox gene

- WOX11 is required to activate shootborne crown root development in rice[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3): 736 – 748.
- [19] Kitomi Y, Ito H, Hobo T, *et al.* The auxin responsive AP2/ERF transcription factor crown rootless5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRR1*, a type-A response regulator of cytokinin signaling[J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(3): 472 – 484.
- [20] Beemster G T S, Baskin T I. STUNTED PLANT 1 Mediates Effects of Cytokinin, But Not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1718 – 1727.
- [21] Müller B1, Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1094 – 1097.
- [22] Wang Y, Wang J, Shi B, *et al.* The Stem Cell Niche in Leaf Axils Is Established by Auxin and Cytokinin in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(5): 2055 – 2067.

(责任编辑:张 研)