

茅苍术细胞分裂素羟化酶基因 (*AlCYP735A*) 的克隆与表达分析

刘越圳¹, 聂小山¹, 尚进^{1,2}, 李婷婷¹, 陈袁袁¹, 王萌¹, 余坤^{1,2}, 黄晓^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北中医药大学 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: **目的** 克隆茅苍术 *Atractylodes lancea* 细胞分裂素羟化酶基因 (*AlCYP735A*, GenBank: PP839072.1), 对其进行生物信息学分析、组织特异性表达分析以及构建原核表达载体对该蛋白进行重组表达。**方法** 从茅苍术 cDNA 中克隆 *AlCYP735A* 序列全长, 利用生物信息学方法分析其编码蛋白的理化性质, qRT-PCR 检测其组织特异性表达情况, 连接 pET28a-mbp 表达载体转入大肠杆菌 BL21 进行重组蛋白的表达, 并在烟草叶片中对其进行了亚细胞定位。**结果** *AlCYP735A* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 1 566 bp, 编码 521 个氨基酸; 拥有 1 个 P450 基因保守域, 相对分子质量为 59 328.6, 等电点为 9.13, 有信号肽, 属于分泌蛋白。qRT-PCR 结果表明其根茎中表达量最高, 与其他组织器官具有较明显差异。重组蛋白 mbp-*AlCYP735A* 获得可溶性表达, 大小符合 106 700 的预期。烟草亚细胞定位显示其定位在叶绿体。**结论** 成功克隆 *AlCYP735A* 的基因, 完成生物信息学分析、阐明组织特异性表达情况和在烟草中的亚细胞定位, 重组蛋白在原核表达系统中获得了可溶性表达, 为后续该基因的功能验证提供了条件。

关键词: 茅苍术; *AlCYP735A*; 基因克隆; 表达分析; 原核表达; 生物信息学

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)09-3253-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.022

Cloning and expression analysis of cytokinin hydroxylase gene *AlCYP735A* from *Atractylodes lancea*

LIU Yuezhen¹, NIE Xiaoshan¹, SHANG Jin^{1, 2}, LI Tingting¹, CHEN Yuanyuan¹, WANG Meng¹, YU Kun^{1, 2}, HUANG Xiao^{1, 2}

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430065, China

2. Hubei Key Laboratory of Resource and Chemistry of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430065, China

Abstract: Objective The gene *AlCYP735A* (GenBank: PP839072.1), coding for cytokinin hydroxylase in *Atractylodes lancea* was cloned for bioinformatic analysis, tissue-specific expression analysis, and recombinant expression using a prokaryotic expression vector. **Method** The full length of *AlCYP735A* was cloned from the cDNA of *A. lancea*, and its physicochemical properties were analyzed using bioinformatics tools. The tissue-specific expression of this gene was examined using qRT-PCR, and it was ligated into the pET28a-mbp expression vector and transformed into *E. coli* BL21 for expression of the recombinant protein. The subcellular localization prediction was carried out in tobacco leaves. **Result** The open reading frame of *AlCYP735A* is 1 566 bp, encoding 521 amino acids. It has a conserved P450 domain, with a relative molecular weight of 59 328.6 and an isoelectric point of 9.13. It contains a signal peptide and is classified as a secretory protein. The qRT-PCR results indicated that its expression is highest in the rhizome, significantly different from other tissues and organs. The recombinant protein mbp-*AlCYP735A* was solubly expressed, with a size consistent with the expected 106 700. Tobacco subcellular localization shows its localization in chloroplasts. **Conclusion** The successful cloning of the *AlCYP735A* gene, completion of bioinformatic analysis, determination of tissue-specific expression, and subcellular localization in tobacco and expression of the recombinant protein in the prokaryotic system provide the groundwork for subsequent functional validation of this gene.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; *AlCYP735A*; gene cloning; expression analysis; prokaryotic expression; bioinformatics

收稿日期: 2024-11-03

基金项目: 湖北省教育厅青年项目 (Q20222013); 湖北省科学技术厅青年项目 (2022CFB576)

作者简介: 刘越圳, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价与开发研究。E-mail: 11823323145@163.com

*通信作者: 黄晓, 副研究员, 硕士导师, 从事中药资源与中药化学研究。E-mail: hxiao0430@hbtcm.edu.cn

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本药用植物, 其药用部位为干燥根茎^[1], 具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效, 临床上常用于湿阻中焦、脘腹胀满、水肿、风寒感冒等症的治疗^[2]。当前, 由于野生资源过度挖采及市场需求的增长, 人工栽培品已经成为了该药材的主要来源^[3]。如何培育茅苍术的优良品种、提升药材品质, 是当前资源保护及其生产者面临的重要问题。因此, 研究茅苍术的生长发育周期, 探究其生长影响因素对种质资源开发与有效成分合成机制有着重要意义。

CYP735A 是属于植物细胞色素 P450 (CYP450s) 超基因家族的一种编码细胞分裂素羟化酶的基因^[4]。细胞分裂素 (cytokinins, CK) 是植物体内调节生长发育、影响细胞分裂分化的关键植物激素^[5]。天然的细胞分裂素包括异戊烯基腺嘌呤 (isoamyl alkenyl adenine, iP)、反式玉米素 (*trans*-Zeatin, tZ)、二氢玉米素 (DH) 和顺式玉米素 (*cis*-Zeatin, cZ)^[6], 其中 iP 和 tZ 在植物体内最为常见^[7]。有研究认为, tZ 在根茎中合成^[8]后由木质部中的维管系统向地上部分运输^[9]; 而 iP 则主要在芽中合成后由韧皮部向下运输影响根的发育^[10], 也有学者提出 iP 可能在韧皮部双向运输从而承担信号传递的任务^[11]。CYP735A 可以将 iP 的合成前体异戊烯基磷酸腺苷羟化为 tZ 的合成前体反式玉米素磷酸腺苷^[9], 对细胞分裂素的合成以及 iP、tZ 植物体内的分布有着重要影响。此外, 有研究表明 CYP735A 的缺失会使植株生长发育迟缓, 植株高度显著降低^[12]; 在模式植物拟南芥中 CYP735A 还可以通过影响 tZ 的合成, 从而影响根及根茎的生长发育^[13]。而茅苍术属于多年生草本, 栽培品的成熟采挖多为 2~3 年, 其地上部分会入冬会枯死, 地下根茎次年长出芽头再生地上部分^[14]。因此, 研究细胞分裂素在茅苍术植株中的时空合成、转化运输对茅苍术的资源保护有重要意义。

本研究对茅苍术的转录组进行挖掘, 成功克隆出了 *AICYP735A* 基因, 然后对其进行生物信息学分析、组织特异性表达分析、烟草亚细胞定位, 最后构建了原核表达载体分析其编码蛋白的可溶性表达产物, 为 *AICYP735A* 基因的后续功能验证、时空差异性表达及调控茅苍术的生命周期、研究根茎品质形成机制等提供了研究基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

完整茅苍术植株取自湖北省黄冈市英山县

茅苍术种植基地, 经湖北中医药大学余坤教授鉴定为菊科植物茅苍术 *A. lancea* (Thunb.) DC.。将其各组织洗净, 经液氮速冻, 存于 -80 °C 冰箱。

1.2 试剂

高多糖多酚植物总 RNA 试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒、快速质粒 DNA 小量试剂盒均购自杭州新景生物试剂开发有限公司, Primes STAR GXL DNA Polymerase、QuickCut Bam H I、QuickCut Xho I、DL 2 000 DNA Marker、DL 5 000 DNA Marker、6 × DNA Loading Buffer、4 × Protein SDS PAGE Loading、Premixed Protein Marker (Low)、T4 DNA Ligase 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 感受态农杆菌 GV3101 购自生工生物工程有限公司, Evo M-MLV 反转录试剂盒 II 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, DH5α Chemically Competent Cell、BL21 (DE3) Chemically Competent Cell 均购自上海唯地生物技术有限公司, Zero Background pTOPO-TA/Blunt Cloning 购自北京艾德莱生物科技有限公司, BrighCycle Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG 购自爱博泰克 (武汉) 生物技术有限公司, pEASY-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自武汉阿斯本生物技术有限公司, IPTG (异丙基硫代半乳糖苷)、考马斯亮兰 R-250 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 引物合成和测序由生工生物工程 (武汉) 有限公司完成, 引物序列见表 1。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 逆转录合成及 PCR 扩增

使用多糖多酚植物总 RNA 试剂盒提取茅苍术叶片 RNA, 通过反转录试剂盒反转录为 cDNA, 置于 -20 °C 备用。利用课题组前期转录组数据^[15]筛选 *AICYP735A* 序列, 设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 总体积为 50 μL: 25 μL 的 PrimesSTAR GXL DNA Polymerase, 正反引物 *AICYP735A*-F、*AICYP735A*-R 各 2 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应程序: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 68 °C 终延伸 10 min; 4 °C 保温。PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测后使用凝胶 DNA 回收试剂盒回收。

表 1 引物信息

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列 (5'→3')	用途
<i>AlCYP735A</i> -F	TTAATCCCCAAATATGAAAT	克隆
<i>AlCYP735A</i> -R	CAACATCTCTCTCACTCTAAGGGCT	
<i>AlCYP735A</i> -q-F	CTTGACGGAGACGGAAC	qRT-PCR
<i>AlCYP735A</i> -q-R	CCATGTAACCCGCATAAC	
<i>AlGAPDH</i> -F	TCCAATGTTTGTGATGGGTGT	qRT-PCR内参
<i>AlGAPDH</i> -R	TGGGTGGCAGTCATAGCG	
<i>AlCYP735A</i> -pET-F	gggcccgaagaattcgatATGAAATTGATGAACGCAA	表达载体构建
<i>AlCYP735A</i> -pET-R	ggtggtggtggtggtccaCTCTAAGGGCTTCAAACA	
<i>AlCYP735A</i> -GFP-F	GCTCTAGAATGAAATTGATGAACGCAATGAG	亚细胞定位载体构建
<i>AlCYP735A</i> -GFP-R	CCGTCGACCTCTAAGGGCTTCAAACACAC	

序列中小写字母代表同源臂碱基序列；下划线代表内切酶识别位点。

The lowercase letters are the homologous arm base sequences; and the underlined letters represent the endonuclease recognition sites.

2.2 *AlCYP735A* 基因克隆测序

将上述胶回收产物（目的基因），连接至 pTOPO-TA/Blunt 载体。胶回收产物 4 μ L，pTOPO-TA/Blunt 载体 2 μ L，10 $\times$ Enhancer 1 μ L，ddH₂O 3 μ L，37 $^{\circ}$ C、30 min。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α ，氨苄霉素抗性 Luria-Bertani (LB) 平板 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后，挑取若干菌落使用 M13 通用引物进行菌落 PCR 选取阳性克隆进行摇菌测序，选取序列匹配的菌落及序列进行下一步实验。

2.3 *AlCYP735A* 生物信息学分析

使用 NCBI 中在线工具 Blastn 程序对序列进行匹配后，用 DNAMAN 7.0 对 *AlCYP735A* 氨基酸序列进行多序列比对，用 MEGA 11 邻位法绘制进化树并利用在线网站 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 进行美化。利用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *AlCYP735A* 基因编码氨基酸的理化性质。利用 ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线分析 *AlCYP735A* 基因编码蛋白质亲/疏水性。利用 SignalP4.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 在线分析工具，对 *AlCYP735A* 基因编码蛋白质进行信号肽预测。利用 PRABI 网站 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 中的 SOPMA 工具和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 网站，对茅苍术 *AlCYP735A* 蛋白的二级、三级结构进行预测。利用 Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 在线分析工具，对 *AlCYP735A* 基因编码蛋白质进行亚细胞定位预测。

2.4 *AlCYP735A* 的特异性表达分析

以同样的方法提取茅苍术各部位 RNA 反转录为 cDNA。以 *AlGAPDH* 作为内参基因，设计 *AlCYP735A* 和 *AlGAPDH* 的 qRT-PCR 引物 *AlCYP735A*-q-F、*AlCYP735A*-q-R、*AlGAPDH*-F、*AlGAPDH*-R (表 1)。采用 10 μ L 的 qRT-PCR 反应体系：BrighCycle Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG 5 μ L，cDNA 1 μ L，正反引物各 0.2 μ L，ddH₂O 3.2 μ L。qRT-PCR 反应条件：37 $^{\circ}$ C 进行 UDG 反应 2 min；95 $^{\circ}$ C、3 min；95 $^{\circ}$ C、5 s，60 $^{\circ}$ C、30 s，40 个循环；熔解曲线为 95 $^{\circ}$ C、15 s，60 $^{\circ}$ C、1 min，95 $^{\circ}$ C、15 s。每个样品设 3 组重复，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AlCYP735A* 基因的组织相对表达量^[16]。

2.5 *AlCYP735A* 原核表达载体的构建

利用无缝克隆的方式构建重组蛋白表达载体。设计带同源臂的 *AlCYP735A* 扩增引物 (表 1)，以测序完成的 pTOPO-TA/Blunt-*AlCYP735A* 质粒载体作为模板进行 PCR 克隆，体系 50 μ L：PrimesSTAR GXL DNA Polymerase 25 μ L，正反引物 *AlCYP735A*-pET-F、*AlCYP735A*-pET-R 各 1 μ L，质粒模板 1 μ L，ddH₂O 22 μ L；反应条件为 98 $^{\circ}$ C、3 min；98 $^{\circ}$ C、10 s，58 $^{\circ}$ C、15 s，68 $^{\circ}$ C、1.5 min，35 个循环；68 $^{\circ}$ C、10 min，4 $^{\circ}$ C 冷却。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收，获得带同源臂的 *AlCYP735A* 基因片段；利用 BamH I 和 Xho I 酶构建 pET28a-*mbp* 线性化载体。PCR 产物和线性化载体采用无缝克隆试剂盒连接构建重组表达载体，连接产物采用热激发转入感受态大肠杆菌 DH5 α ，涂布于含卡那霉素的 LB 平板，37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取单菌落进行

菌落 PCR 验证, 挑选 PCR 阳性菌落送至武汉生工生物工程公司测序。选取测序正确的菌落摇菌进行质粒提取, 相同方法转入感受态大肠杆菌 BL21 并涂布培养。同样的方法构建转入 pET28a-mbp 表达载体的 BL21 作为阴性对照。

2.6 AICYP735A 重组蛋白的表达

挑取 LB 平板上转入重组表达载体 pET28a-mbp-AICYP735A 的 BL21 单菌落, 扩大培养至 20 mL, 待菌液 600 nm 吸光度 (A_{600}) = 0.6~0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 置于摇床 16 °C 恒温诱导 16 h。诱导结束后, 低温离心收集菌体后用 PBS 重悬, 冰浴下超声破碎, 留存部分作为总蛋白, 剩余低温离心后吸取上清, 沉淀部分用 PBS 重悬。取总蛋白、上清、沉淀液加入蛋白上样缓冲液, 金属浴变性。阴性对照采取同样的处理方法, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳检测后, 经考马斯亮蓝染色脱色观察蛋白表达情况。

2.7 AICYP735A 亚细胞定位载体的构建和观察

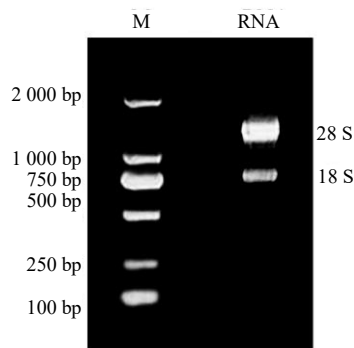
以测序完成的 pTOPO-TA/Blunt-AICYP735A 质粒作为模板, 利用带 XbaI 和 SalI 酶切位点的引物 AICYP735A-GFP-F、AICYP735A-GFP-R (表 1) 进行 PCR 克隆, 方法与上述一致。产物片段和亚细胞定位载体 pCNG-GFP 用 XbaI 和 SalI 内切酶进行线性化, T4 DNA 连接酶构建重组载体 pCNG-GFP-AICYP735A, 并与上述操作一致进行大肠杆菌 DH5 α 转化、菌落 PCR 及测序验证。取测序结果正确的重组质粒 5 μ L 利用热激法转入农杆菌 GV3101, 涂布于卡纳霉素抗性的 LB 平板, 28 °C 培养 48 h 后挑取单菌落于含卡纳霉素抗性的 LB 培养基中培养 24 h, 在 10 mmol/L 的 2-吗啉乙磺酸 (2-morpholinoethanesulphonic acid, MES)、10 mmol/L 的 MgCl₂、200 μ mol/L 的乙酰丁香酮 (AS) 溶液中重悬至菌液 A_{600} = 0.5 并诱导培养 1 h。用无菌注射器吸取菌液对培养 6 周龄的本氏烟草下表皮进行注射, 至菌液浸润整个叶片。注射后的烟草在暗处理 12 h 后培养 3 d, 激光共聚焦显微镜观察注射后叶片的下表皮, 利用 488 nm 激光进行激发, 收集 510 nm 处的 GFP 荧光和 675 nm 处的叶绿体荧光。pCNG-GFP 空载体也进行上述操作转染烟草作为阴性对照。

3 结果与分析

3.1 AICYP735A 基因克隆与测序

提取茅苍术叶片总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 18S RNA 和 28S RNA 条带明显易见 (图

1), 经过微量核酸定量仪分析处理, 可得 A_{260}/A_{280} 为 2.271, 质量浓度为 297.242 μ g/mL, 说明提取的 RNA 完整性好, 可以用于后续的实验。以提取合格的 RNA 反转录所得的 cDNA 为模板, 用 AICYP735A 特异性引物进行全长扩增, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 发现在 1 500 bp 左右有明亮的条带, 与目的基因基本一致 (图 2)。将琼脂糖凝胶回收纯化以后的产物与 pTOPO-TA/Blunt 载体连接以后, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 氨苄霉素 LB 平板 37 °C 培养 12 h, 筛选阳性菌落进行测序, 结果与转录组相吻合。

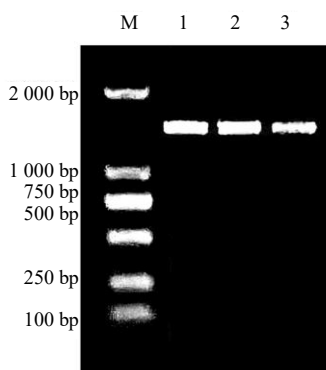


M-Marker; RNA-叶片总 RNA。

M-Marker; RNA-total RNA in leaves.

图 1 总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA gel electrophoresis



M-Marker; 1~3-PCR 扩增产物。

M-Marker; 1~3-PCR amplification products.

图 2 AICYP735A 基因扩增产物

Fig. 2 AICYP735A gene amplification products

3.2 AICYP735A 基因的生物信息学分析

3.2.1 AICYP735A 基因的多序列比对和系统进化树的构建 AICYP735A 基因序列长度为 1 566 bp, 其开放阅读框长度 1 566 bp, 编码 521 个氨基酸。利用 DNAMAN 7.0 软件, 将茅苍术 AICYP735A 蛋白的氨基酸序列和菜蓟 *C. cardunculus* var. *scolymus*、向日葵

H. annuus L.、莴苣 *L. sativa* L.、小蓬草 *E. canadensis* L.的 CYP735A 蛋白氨基酸序列进行多序列比对,结果表明上述 4 个物种具有高度同源性(图 3)。将 NCBI

网站中 Blastn 程序获取的 45 个 AICYP735A 的亲缘蛋白氨基酸序列,使用 MEGA 11 构建进化树,发现茅苍术 AICYP735A 氨基酸序列与菜蓟,向日葵和莸

菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	MKLMITMSVVLWASLLIFLYLFIKITYQILTCYLLTPRIKINIMRQGVGPK	53
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	MKLIIMSGVVLWAPLLVFLVFLKIAVEFLTCYLLTPRIKINIMRQGVGPK	53
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	MKLMNTMGVVLWACLAFVFLFIKIAVEFLTCYLLTPRIKINIMRQGVGPK	53
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	MGIVLWACLIVVFLFIKISYQILDSYLLTPRIKINIMRQGVGPK	47
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	MKLMNMSMVLWASLLVFLVFLFIKIAVEFLTCYLLTPRIKINIMRQGVGPE	53
Consensus	m vlwa ll yl k y tl yl tp riknim rgg gp	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	PRFLIGNLDDWASLLSKSTSFDMPSIDHDIIVERLLPHLVLWSKIYGRFIYWN	106
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	PRFLIGNLDDWASLLSKSTSFDMPSIDHDIIVERLLPHLVLWSKIYGRFIYWN	106
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	PRFLIGNLDDAALLSKSTSFDMPTIDHDIIVERLLPHLVLWSKIYGRFIYWN	106
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	PRFLIGNLDDWASLLSKSTSFDMPLYDHDIVERRLLPHLVLWSKIYGRFIYWN	100
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	PRFLIGNLDDWASLLSKSTSFDMPSIDHDIIVERLLPHLVLWSKIYGRFIYWN	106
Consensus	p fl gnl d a l sksts dm idhdiv rllph lwskiygrfiywn	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	GTEPRMCLTETDLIKELLVKHSTISGKSWLQQQGGKHFGRGLLMANGDWHH	159
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	GTEPRMCLTETDLIKELLVKHSTISGKSWLQQQGGKHFGRGLLMANGDWHH	159
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	GTEPRMCLTETDLIKELLVKHSTISGKSWLQQQGGKHFGRGLLMANGDWHH	159
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	GTEPRMCLTETDLIKELLVKHSTISGKSWLQQQGGKHFGRGLLMANGDWHH	153
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	GTEPRMCLTETDLIKELLVKHSTISGKSWLQQQGGKHFGRGLLMANGDWHH	159
Consensus	gteprmc lt t likellvkst sgkswlqqgg khfigrgllmang dw h	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	QRHIVAPAFMRDKLSYASYMECTKEMIQSMEKEVATGTEFEIGYMAQLT	212
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	QRHIVAPAFMRDKLSYASYMECTKEMIRSMKEVAMGREFEIGYMAQLT	212
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	QRHIVAPAFNDKLSYASYMECTMEMIQSKAELEKGRVEFEIGECMARLT	212
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	QRHIVAPAFMRDKLSYASYMECTKEMIESLEKQLVRGQVEFEIGYMAQLT	206
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	QRHIVAPAFMRDKLSYASYMECTKDMIQSMEKEVATGRSEFEIGYMAQLT	212
Consensus	qrhivapaf dklksya ym ect m i s g efeig ma lt	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	ADIISRTFDSSEKKGQIFHLLTVLQQLCAQASRHLCPGSRFIPSKYNREI	265
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	ADIISRTFDSSEKKGQIFHLLTVLQQLCAQASRHLCPGSRFIPSKYNREI	265
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	ADIISRTFDSSEKKGQIFHLLTVLQQLCAQASRHLCPGSRFIPSKYNREI	265
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	ADIISRTFDSSEKKGQIFHLLTVLQQLCAQASRHLCPGSRFIPSKYNREI	259
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	ADIISRTFDSSEKKGQIFHLLTVLQQLCAQASRHLCPGSRFIPSKYNREI	265
Consensus	adiisrtefd s ekgkqif llt lqqlcaqasrhlc pgsrf psdynrei	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	KSLKMEVERLLMEIISQRDCEVIGRSSSYGNLLGMLLNEMOKKRGNGFSL	318
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	KSLKMEVERLLMEIISQRDCEVIGRSSSYGNLLGMLLNEMOKKRGNGFSL	318
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	KSLKMEVERLLMEIISQRDCEVIGRSSSYGNLLGMLLNEMOKKRGNGFSL	318
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	KSLKMEVERLLMEIISQRDCEVIGRSSSYGNLLGMLLNEMOKKRVNGFSL	312
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	KSLKMEVERLLMEIISQRDCEVIGRSSSYGNLLGMLLNEMOKKRGNGFSL	318
Consensus	kslkmeverllmeiisqr dcevirgrsssyg dllgmllnem kkr ngf l	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	NLQVIMDECKTFFFGAGHETTALLTWTIMLLASNPSWQDKVRAEVRVCNGGS	371
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	NLQVIMDECKTFFFGAGHETTALLTWTIMLLASNPSWQDKVRAEVRVCNGGS	371
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	NLQVIMDECKTFFFGAGHETTALLTWTIMLLASNPSWQDKVRAEVRVCNGGS	371
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	NLQVIMDECKTFFFGAGHETTALLTWTIMLLASNPSWQDKVRAEVRVCNGGY	365
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC..	NLQVIMDECKTFFFGAGHETTALLTWTIMLLASNPSWQDKVRAEVRVCNGGS	371
Consensus	nlqvimdecktfffgaghetallltwtimlla n swgdkvr evr veng	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	PSVEHLSKLSLNMVINESRLYPASVLPMAFEDIPLGDLIPKGLSIWIP	424
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	PSVEHLSKLSLNMVINESRLYPASVLPMAFEDIPLGDLIPKGLSIWIP	424
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	PSVEDLSKLSLNMVINESRLYPASVLPMAFEDIPLGDLIPKGLSIWIP	424
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	PSVEHLSKLSLNMVINESRLYPATVLPMAFEDIPLGDLIPKGLSIWIP	418
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	PSVEHLSKLSLNMVINESRLYPASVLPMAFEDIPLGDLIPKGLSIWIP	424
Consensus	ps e lskls lnmvi eslryppa lprm fedi lgdl ipkglsiwip	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	VLAIHSEEIWGDNEFNENRFASKSFSPGRHFMPFAAGPRNCVGQSALME	477
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	VLAIHSEEIWGDNEFNENRFASKSFSPGRHFMPFAAGPRNCVGQSALME	477
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	VLAIHSEEIWGDNEFNENRFASKSFSPGRHFMPFAAGPRNCVGQSALME	477
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	VLAIHSEEIWGDNEFNENRFASKSFSPGRHFMPFAAGPRNCVGQSALME	471
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	VLAIHSEEIWGDNEFNENRFASKSFSPGRHFMPFAAGPRNCVGQSALME	477
Consensus	vlaiahh iwg d nefnp rfa fs rhfmpfaagprncvgqsalm	
菜蓟 <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> XP024975495.1	AKIILAMLSIKRFETISDSYRHAPVIVLTIKPKYGVQVCLKPLEEGET	525
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> XP023770955.1	AKIILAMLSIKRFETISDSYRHAPVIVLTIKPKYGVQVCLKPLEE...	522
向日葵 <i>Helianthus annuus</i> XP021998461.1	AKIILAMLSIKRFETISDSYRHAPVIVLTIKPKYGVQVCLKPLEE...	522
小蓬草 <i>Erigeron canadensis</i> XP043608428.1	AKIILAMLSIKRFETISDSYRHAPVIVLTIKPKYGVQVCLKPLEE...	516
茅苍术 <i>Atractylodes lancea</i> Thunb. DC.	AKIILAMLSIKRFETISDSYRHAPVIVLTIKPKYGVQVCLKPLEE....	521
Consensus	akiil mli kf f i d yrhap vltikpygvqvcclkpl	

深蓝色: 相似性为 100%; 粉红色: 相似性 75%以上; 蓝色: 相似 50%以上。

Dark blue: 100% similarity; Pink: more than 75% similarity; Blue: more than 50% similar.

图 3 AICYP735A 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multi-sequence alignment of AICYP735A protein

苣荬菜科植物 CYP735A 氨基酸序列同源性高, 聚类在同一枝。此外, AICYP735A 蛋白还与茄科、旋花科、芝麻科等科属部分植物的 CYP735A 蛋白具

有相似的进化关系, 这提示该基因在进化方向上与其他菊科植物及茄科、旋花科、芝麻科、蔷薇科等科属植物相似 (图 4)。

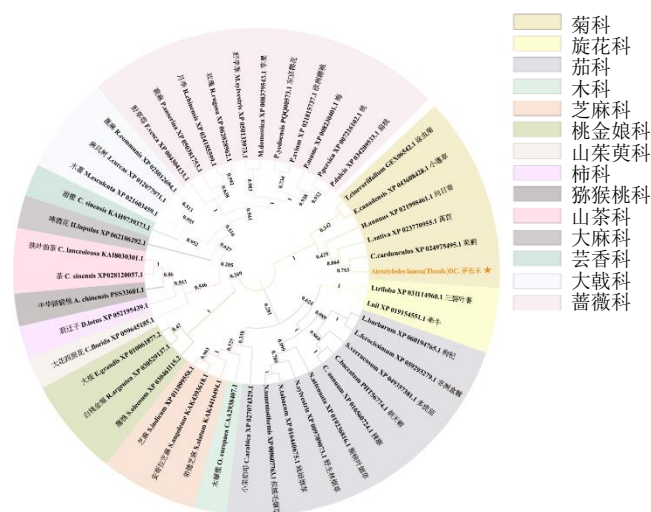


图 4 AICYP735A 蛋白的物种进化树

Fig. 4 Species phylogenetic tree of AICYP735A protein

3.2.2 AICYP735A 蛋白的理化性质分析 利用 NCBI Conserved Domain 检索发现 AICYP735A 蛋白属于 P450 家族糖蛋白 (PLN02290 family protein), 数据库显示在 6~520 个氨基酸范围内存在 P450 蛋白的保守结构域 (图 5)。利用 Exasy-ProtParam tool 预测 AICYP735A 蛋白氨基酸的理化性质, 发现该蛋白质共有 521 个氨基酸, 理论蛋白质分子式为 $C_{2674}H_{4241}N_{719}O_{734}S_{35}$, 相对分子质量为 59 328.6, 等电点为 9.13, 不稳定系数为 45.12, 脂肪族指数为 96.37, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.032。AICYP735A 蛋

白的 521 个氨基酸中, 含量最高的是亮氨酸为 12.1%, 其次是丝氨酸为 8.4% 和异亮氨酸为 6.9%, 最低为色氨酸为 1.7%。预测其总原子数为 8 403, 带负电残基 (Asp+Glu) 49 个, 带正电残基 (Arg+Lys) 62 个。利用 Exasy-ProtScale 在线分析茅苍术 AICYP735A 蛋白质亲/疏水性, 发现所预测第 19 个氨基酸疏水性最大, 为 3.133, 第 157 个氨基酸亲水性最大, 为 -2.911, 从整条肽链的预测值来看, 大部分氨基酸为负值, 结果说明 AICYP735A 蛋白是亲水性蛋白 (图 6)。

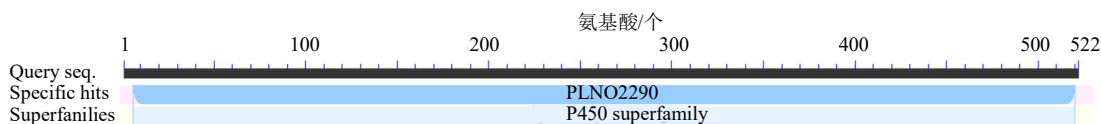


图 5 AICYP735A 蛋白结构域分析

Fig. 5 Protein domain analysis of AICYP735A

3.2.3 AICYP735A 蛋白信号肽、磷酸位点、跨膜区和亚细胞定位预测 利用 SignalP4.1 Server 在线分析工具, 对 AICYP735A 蛋白进行信号肽预测, 结果指出 AICYP735A 蛋白 N 端信号肽平均值为 0.558, 大于 0.500, 故推测 AICYP735A 蛋白结构含信号肽, 属于分泌蛋白 (图 7)。通过 NetPhos. 3.1Server 在线预测, AICYP735A 蛋白有 42 个 Ser 位点, 14 个 Thr 位点, 5 个 Tyr 位点。利用在线软

件 Cell-PLoc 在线网站进行预测, 预测结果显示该蛋白定位在叶绿体。

3.2.4 AICYP735A 蛋白二级结构和三级结构预测分析 利用 SOPMA 在线分析工具, 对 AICYP735A 蛋白的二级结构进行预测, 结果表明在 AICYP735A 蛋白结构 (α 螺旋 53.17%, 延伸链 11.25%, 无规则卷曲 29.37%, 转角 5.59%) 中, 无规则卷曲和 α 螺旋是构成二级结构最主要的方式。利用 SWISS-

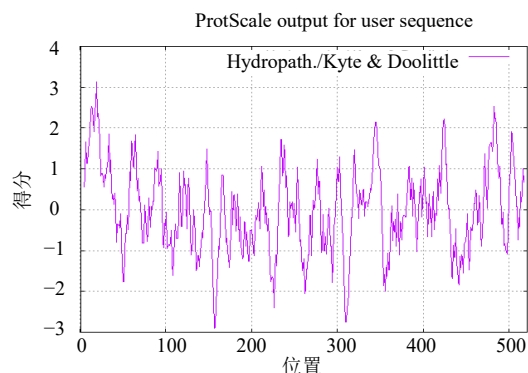


图 6 AICYP735A 蛋白亲水性/疏水性预测

Fig. 6 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of AICYP735A protein

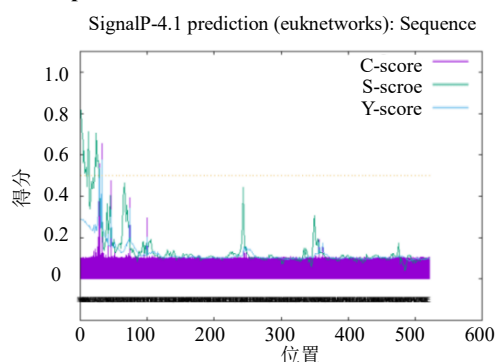


图 7 AICYP735A 蛋白信号肽预测

Fig. 7 Prediction of signal peptide of AICYP735A protein
MODEL 在线分析工具, 对 AICYP735A 蛋白的三级结构进行预测 (图 8), 其三级结构符合二级结构的推测。

3.3 AICYP735A 基因组织特异性表达分析

为研究茅苍术 AICYP735A 基因组织特异性表达分析差异, 通过实时荧光定量技术 (qRT-PCR) 检测了 AICYP735A 在花、叶、茎、根茎的表达情况, 结果显示 AICYP735A 在 4 个部位的表达情况具有显著差异。在根茎中表达量最高, 其次是花、茎、叶, 在叶中的表达量最低 (图 9)。该结果与其他

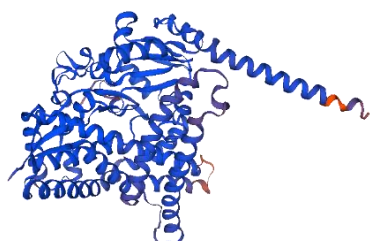
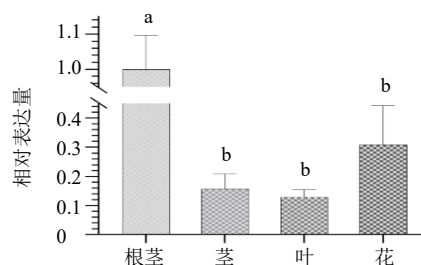


图 8 AICYP735A 蛋白三级结构

Fig. 8 Tertiary structure of AICYP735A protein



a、b 代表差异显著, $P < 0.05$ 。

a and b represent significant differences, $P < 0.05$.

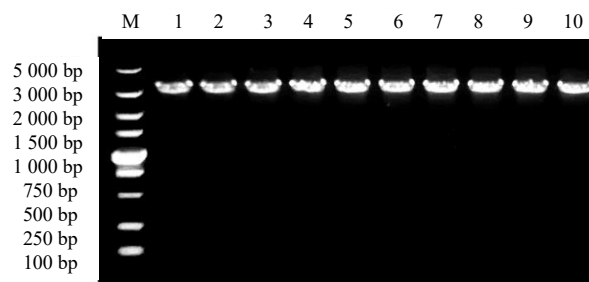
图 9 AICYP735A 组织特异性表达

Fig. 9 Tissue-specific expression of AICYP735A

植物 CYP735A 基因表达分布情况基本一致。符合 AICYP735A 在植物体内所发挥的生理作用情况。

3.4 AICYP735A 原核表达载体的构建及表达

构建 mbp-AICYP735A 重组表达载体, 转入 DH5 α 进行了菌落 PCR 验证 (图 10), 采用 T7 通用引物对的 PCR 产物预期条带长度约为 3 000 bp, 琼脂糖凝胶检测结果符合预期, 挑选部分阳性菌落测序的结果均正确。选取测序正确的菌落摇菌提取重组质粒, 转入大肠杆菌 BL21 利用 IPTG 诱导表达。表达后的菌液经离心、重悬、超声破碎。阴性对照为转入 pET28a-mbp 载体的 BL21 经相同处理后一并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。结果可见 (图 11), 只含有 mbp 的空表达载体仅在预测的 49 100 处有表达, 而 mbp-AICYP735A 融合蛋白约在 100 000 处上清、沉淀中均有一定表达, 与预期的 106 700 相符。说明重组载体在大肠杆菌中成功获得了可溶性表达。

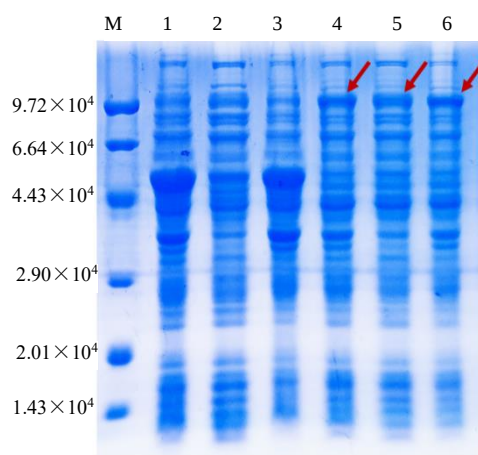


M-Marker; 1~10-DH5 α (PET28a-mbp-AICYP735A) 的菌落 PCR 产物。

M-Marker; 1~10-Colony PCR product of DH5 α (PET28a-mbp-AICYP735A).

图 10 PET28a-mbp-AICYP735A 重组载体的菌落 PCR 验证

Fig. 10 Colony PCR validation of PET28a-mbp-AICYP735A recombinant vector



M-Marker; 1-pET28a-mbp 空载体总蛋白; 2-pET28a-mbp 空载体上清; 3-pET28a-mbp 空载体沉淀; 4-pET28a-mbp-AICYP735A 总蛋白; 5-pET28a-mbp-AICYP735A 上清; 6-pET28a-mbp-AICYP735A 沉淀。

M-Marker; 1-pET28a-mbp empty vector total protein; 2-pET28a-mbp empty vector supernatant; 3-pET28a-mbp empty vector precipitation; 4-pET28a-mbp-AICYP735A total protein; 5-pET28a-mbp-AICYP735A supernatant; 6-pET28a-mbp-AICYP735A precipitation.

图 11 AICYP735A 原核表达 SDS-PAGE 检测

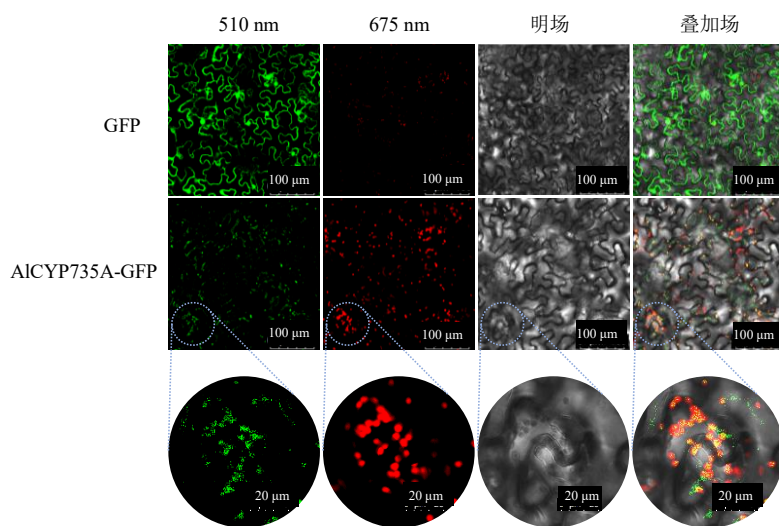
Fig. 11 Detection of AICYP735A prokaryotic expression by SDS-PAGE

3.5 AICYP735A 蛋白的亚细胞定位观察

为了确定 AICYP735A 蛋白定位在哪个细胞器发挥功能, 构建了 pCNG-35S-GFP-AICYP735A 亚细胞定位载体。农杆菌 GV3101 转染的烟草荧光观测结果 (图 12) 中绿色为 GFP 蛋白激发荧光, 红色为叶绿体激发荧光。空载体的 GFP 荧光散布在整个细胞, 重组蛋白 GFP-AICYP735A 的绿色荧光与红光重合, 在叠加场中以黄色显示, 说明叶绿体是 AICYP735A 蛋白发挥功能的亚细胞器。

4 讨论

细胞分裂素是一类在植株整个生命周期发挥重要作用的植物激素, 参与调控植物细胞增殖分化、生长发育、植株的生长与衰老等生理过程^[12, 17-19]。内源性细胞分裂素主要是 tZ 和 iP^[9]。细胞分裂素羟化酶 CYP735A 可以催化异戊烯基磷酸腺苷 (iPRTP/iPRDP/iPRMP) 单加氧生成反式玉米素磷酸腺苷 (tZ RTP/tZ RDP/tZ RMP)^[9]; (iPRTP/iPRDP/iPRMP 和 tZ RTP/tZ RDP/tZ RMP 别为 iP 和 tZ 合成的前体; 其中 iPRTP/iPRDP/iPRMP 则是由二甲基烯丙基二磷酸 (DMA (ATP/ADP/AMP) 在磷酸腺苷-异戊烯基转移酶 (isopentenyl transferases, IPT) 的



采用 488 nm 激光进行激发, 510 nm 收集 GFP 荧光, 675 nm 收集叶绿体激发荧光。

The laser was excited at 488 nm, GFP fluorescence at 510 nm, and chloroplasts excite fluorescence at 675 nm.

图 12 AICYP735A 蛋白的亚细胞定位

Fig. 12 Subcellular localization of AICYP735A protein

催化下合成^[20]。因此, CYP735A 表达水平的调节在影响植株体内 iP 和 tZ 的动态水平有着重要作用。而参与高等植物的细胞分裂素运输主要是 iP 和 tZ^[21], 研究发现 iP 主要以前体形式存在于韧皮部

中^[22], tZ 则以其前体形式存在木质部中。细胞分裂素前体主要在根及根茎中合成^[23], 并以 tZ 各前体形式向地上部分运输^[24], 而 iP 前体则有猜想认为其在韧皮部中双向运输充当信号传递的角色^[11]。

CYP735A 是参与 iP 前体往 tZ 前体转化的关键酶；不难得出，CYP735A 在影响植株细胞分裂素的空间分布上也起到关键作用。因此，成功克隆茅苍术 *AlCYP735A* 基因并构建蛋白表达载体，可以为后期研究其影响茅苍术生长发育过程以及植物激素间之间互相调节作用提供理论和研究基础。

本研究从茅苍术转录组中筛选出了茅苍术 *AlCYP735A* 基因，并成功在 cDNA 中得到了全长克隆。对其进行生物信息学分析发现，*AlCYP735A* 开放阅读框 1 566 bp，编码氨基酸 521 个；相对分子质量为 59 328.6，等电点为 9.13，为亲水性蛋白，亚细胞定位在叶绿体中，拥有 1 个 P450 基因保守结构域。进化关系与序列比对结果显示，茅苍术 *AlCYP735A* 氨基酸序列和菜蓟、向日葵、莴苣、小蓬草等菊科植物亲缘关系较近；编码长度都在 516~526 个氨基酸；其中与菜蓟的相似度达到了 96.55%；在参与进化树构建的其它物种 CYP735A 中，与 *AlCYP735A* 的氨基酸相似度均在 80% 以上。进化树主要分为 3 大枝，其中菊科植物单独聚为一支，另外 2 枝主要以茄科和蔷薇科植物为主，与茅苍术一样多为草本及亚灌木。说明其在菊科和其他亲缘种属中的进化高度保守，暗示其功能存在的相似性。在已有的研究中发现，马尾松 *PmCYP735A* 在根、茎、叶中的表达水平逐渐降低^[25]，铁皮石斛的 *DenCYP735A* 同样显示出在根中出现最高表达^[26]；在本研究对茅苍术不同部位的 qRT-PCR 结果中，*AlCYP735A* 根茎中的表达量最高，茎、花和叶中表达量较低；这与已有的研究结论相符，也符合细胞分裂素在根茎中合成并向上运输的理论。

在调节根部发育方面，细胞分裂素在水稻根系伸长和侧根发育方面起到调控作用^[27]，细胞分裂素的合成调控能影响人参榕块根的膨大发育^[28]。在木质部和韧皮部的分化方面，有充分的证据表明木质部的形成受细胞分裂素的抑制^[29]。而茅苍术的有效成分多为挥发油类，油室多存在于根茎皮层、韧皮部、射线和髓部中^[30]，而不存在于木质部。因此研究茅苍术根茎中细胞分裂素水平的调控对其有效成分含量水平有一定帮助。同时，植物防御反应研究中，细胞分裂素在模式植物拟南芥在对抗十字花科根肿病菌中起到关键作用^[31]；还有证据表明，细胞分裂素在拟南芥中 R 蛋白介导的免疫反应起到重要作用，CYP735A 则能通过细胞分裂素前体的转换来实现运输方向的改变，从而在植物体内各器官中

细胞分裂素水平的调控起到枢纽作用^[32]。现今茅苍术栽培品大规模种植，受线虫侵害^[33]、根腐病^[34]等影响品质和产量。故研究茅苍术 *AlCYP735A* 能为茅苍术根茎品质形成、有效成分含量提升、抗虫抗病等方面的研究奠定基础。

本研究利用 pCNG 亚细胞定位载体对 *AlCYP735A* 重组蛋白进行了亚细胞定位，判断其定位在叶绿体中，推测叶绿体是其发挥活性功能的细胞器。大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 pET28a-mbp 表达载体成功构建了茅苍术 *AlCYP735A* 基因的原核表达系统，并在上清中获得了可溶性表达，获得了带 mbp 标签的 *AlCYP735A* 重组蛋白。后续利用蛋白酶对 mbp 标签进行切除，可验证 *AlCYP735A* 重组蛋白的生物学活性。这为后期 *AlCYP735A* 的研究提供了参考，也为茅苍术的优势品种选育、探究其生命周期、有效成分合成规律等工作提供了理论和研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 173.
- [2] 薛东华, 徐宁阳, 李星宜, 等. 苍术治疗脾胃疾病研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(7): 118-121.
- [3] 侯芳洁. 茅苍术的种质资源调查及品质评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.
- [4] Takei K, Yamaya T, Sakakibara H. *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 41866-41872.
- [5] Li S M, Zheng H X, Zhang X S, et al. Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response [J]. *Plant Cell Rep*, 2021, 40(2): 271-282.
- [6] Mok D W, Mok M C. Cytokinin metabolism and action [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 89-118.
- [7] Kieber J J, Eric Schaller G. Cytokinin signaling in plant development [J]. *Development*, 2018, 145(4): dev149344.
- [8] Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyl transferase genes in *Arabidopsis*: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate [J]. *Plant J*, 2004, 37(1): 128-138.
- [9] Hirose N, Takei K, Kuroha T, et al. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(1): 75-83.
- [10] Liu C J, Zhao Y, Zhang K. Cytokinin transporters: Multisite players in cytokinin homeostasis and signal

- distribution [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 693.
- [11] Gelová Z, ten Hoopen P, Novák O, *et al.* Antibody-mediated modulation of cytokinins in tobacco: Organ-specific changes in cytokinin homeostasis [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(3): 441-454.
- [12] Cai L, Zhang L, Fu Q, *et al.* Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes *IPTs*, *CYP735A* and *CKXs* in the biofuel plant *Jatropha curcas* [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4812.
- [13] Kiba T, Takei K, Kojima M, *et al.* Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2013, 27(4): 452-461.
- [14] 关强, 魏玉霞, 梁固城, 等. 苍术生长发育规律研究初报 [J]. 中药材, 1992, 15(1): 5-6.
- [15] Huang Q, Huang X, Deng J, *et al.* Differential gene expression between leaf and rhizome in *Atractylodes lancea*: A comparative transcriptome analysis [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 348.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] Cortleven A, Leuendorf J E, Frank M, *et al.* Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants [J]. *Plant Cell Environ*, 2019, 42(3): 998-1018.
- [18] Zürcher E, Liu J C, di Donato M, *et al.* Plant development regulated by cytokinin sinks [J]. *Science*, 2016, 353(6303): 1027-1030.
- [19] Yang W B, Cortijo S, Korsbo N, *et al.* Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2021, 371(6536): 1350-1355.
- [20] Wu W Q, Du K, Kang X Y, *et al.* The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 118.
- [21] Davière J M, Achard P. Organ communication: Cytokinins on the move [J]. *Nat Plants*, 2017, 3: 17116.
- [22] Zhao J Z, Deng X J, Qian J Y, *et al.* *Arabidopsis* ABCG14 forms a homodimeric transporter for multiple cytokinins and mediates long-distance transport of isopentenyl-ladenine-type cytokinins [J]. *Plant Commun*, 2023, 4(2): 100468.
- [23] Zürcher E, Müller B. Cytokinin synthesis, signaling, and function: Advances and new insights [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 324: 1-38.
- [24] Osugi A, Kojima M, Takebayashi Y, *et al.* Systemic transport of *trans*-Zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots [J]. *Nat Plants*, 2017, 3: 17112.
- [25] 徐梦璇, 吴玲, 类彦东, 等. 马尾松细胞分裂素羟化酶基因 *PmCYP735A* 克隆与表达分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(6): 864-872.
- [26] 张殿清. 铁皮石斛细胞分裂素合成关键酶基因 CYP735A、IPT 的克隆及表达研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- [27] Wang C G, Wang G K, Gao Y, *et al.* A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 102(4/5): 373-388.
- [28] 李俊慧. 人参榕块根膨大过程细胞分裂素与相关基因表达研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [29] 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.
- [30] 朱利霞, 汪旭, 李鸿翔, 等. 苍术药材的横切面显微鉴别研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3): 530-534.
- [31] Siemens J, Keller I, Sarx J, *et al.* Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19(5): 480-494.
- [32] Igari K, Endo S, Hibara K I, *et al.* Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, 55(1): 14-27.
- [33] Huang X, Yan C C, Chen L, *et al.* First report of northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on *Atractylodes lancea* in Hubei Province, China [J]. *Plant Dis*, 2022, 107(3): 969.
- [34] You J M, Lin X M, Guo J, *et al.* First report of root rot on *Atractylodes macrocephala* (largehead *Atractylodes rhizome*) caused by *Ceratobasidium* sp. in China [J]. *Plant Dis*, 2013, 97(1): 139.

[责任编辑 时圣明]