

生姜IPT基因家族的鉴定与表达分析

席克勇¹, 田野¹, 王艳红¹, 刘奕清¹, 尹军良², 梁红艳³, 朱学栋¹, 朱永兴¹

(¹长江大学园艺园林学院/长江大学香辛作物研究院, 湖北荆州 434025; ²长江大学农学院, 湖北荆州 434025;

³荆州农业科学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 生姜是一种重要的“药食同源”植物,但其种植过程中容易受到各种生物/非生物胁迫的影响,不利于生姜的安全生产。异戊烯基转移酶(IPT, isopentenyl-transferases)是催化细胞分裂素生物合成的关键酶,也是重要的限速酶,与植物的抗逆性关系密切。本研究通过系统的生物信息学分析,从生姜基因组中鉴定到10个*ZoIPT*,并且将其命名为*ZoIPT1~ZoIPT10*。其编码蛋白的氨基酸长度范围在283~491 aa之间,分子质量在31.14~54.02 kDa,等电点在4.97~9.37之间;蛋白质特征分析表明,所有*ZoIPTs*均具亲水性。共线性关系分析发现生姜*IPT*基因与15个芭蕉*IPT*基因存在共线性,与1个拟南芥*IPT*基因存在共线性。转录组数据分析结果显示,*ZoIPTs*有一定的组织表达特异性,并且能响应病害、低温等逆境胁迫,其中,*ZoIPT3*和*ZoIPT5*在生姜不同生长时期、不同部位、低温和病害胁迫下均有较高表达。qRT-PCR分析结果表明,*ZoIPTs*响应干旱、淹水、盐胁迫。在淹水和盐胁迫下,根茎中*ZoIPT3*表达量显著上升;在干旱胁迫下,叶和根茎中*ZoIPT5*的表达显著上升。综上所述,本研究通过系统的鉴定、进化分析、特征分析、启动子分析、表达模式分析,并对干旱、盐、淹水胁迫下的表达模式进行了分析,为深入研究*ZoIPT*在调控生姜生长发育和抗逆性中的生物学功能提供了理论基础。

关键词: 生姜;IPT;生物信息学分析;表达分析

Identification and Transcriptional Profile Analysis of IPT Gene Family Members in Ginger

XI Keyong¹, TIAN Ye¹, WANG Yanhong¹, LIU Yiqing¹, YIN Junliang²,

LIANG Hongyan³, ZHU Xuedong¹, ZHU Yongxing¹

(¹College of Horticulture and Gardening, Yangtze University/Xiangxin Crop Research Institute, Yangtze University,

Jingzhou 434025, Hubei; ²College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei;

³Jingzhou Academy of Agricultural Sciences, Jingzhou 434025, Hubei)

Abstract: Ginger is an important vegetable crop that can be used as medicine and food, but it is sensitive to various biotic and abiotic stresses during its cultivation, which is detrimental to the safe production. Isopentenyl-transferases (IPTs) are key enzymes that catalyze the biosynthesis of cytokinin and are also important rate-limiting enzymes of cytokinin, and it is closely related to the stress resistance of plants. Here, ten *ZoIPTs* had been identified from ginger genome through the bioinformatics analysis, designated *ZoIPT1~ZoIPT10*. The encoded protein ranged from 283 to 491 amino acids, with the molecular weight of 31.14 to 54.02 kDa, and the isoelectric point pI of 4.97 to 9.37. All these *ZoIPTs* were predicted to be hydrophilic. Transcriptome data analysis showed that *ZoIPTs* showed tissue-specific transcriptional patterns and could respond to stress treatments such as

收稿日期: 2023-08-02 修回日期: 2023-09-01 网络出版日期: 2023-09-15

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230802002>

第一作者研究方向为蔬菜逆境生理研究, E-mail: xky1172731440@163.com

通信作者: 朱永兴, 研究方向为蔬菜逆境生理研究, E-mail: xbnlzyx@163.com

朱学栋, 研究方向为农业植物科学研究, E-mail: ozzy2311670@163.com

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2021BBA097, 2022BBA0061); 荆州市2022年度科技计划(2022BB36); 重庆英才·优秀科学家项目(CQYC20220101514)

Foundation projects: Key Research and Development Program of Hubei Province, China (2022BBA0061, 2021BBA096); The Scientific and Technological Projects of Jingzhou, Hubei Province, China (2022BB36); Chongqing Outstanding Scientist Program (CQYC20220101514)

disease and low temperature. *ZoIPT3* and *ZoIPT5* were highly expressed at different growth stages, different tissues, and in response to low temperature and disease stress. qRT-PCR analysis showed that *ZoIPTs* was responsive to drought, flooding and salt stress. Under flooding and salt treatment conditions, the significant induction of *ZoIPT3* in rhizomes was observed. Under drought stress, the expression of *ZoIPT5* in leaves and rhizomes were significantly increased. In summary, with the results of the systematic identification, evolutionary analysis, characteristic analysis, promoter analysis, as well as transcriptional pattern analysis, and analyzed the expression patterns of *ZoIPT* genes under drought, flooding and salt stress, this study provided a theoretical basis for further in-depth research on the biological functions of *ZoIPTs* in regulating growth and development and stress responses in ginger.

Key words: *Zingiber officinale* Roscoe.; IPT; bioinformatics analysis; expression analysis

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe.),又名百辣云,是姜科姜属多年生草本宿根植物,起源于东南亚热带雨林地区,在世界范围内广泛种植^[1]。我国是世界上生姜生产规模和国际贸易量最大的国家,根据国家特色蔬菜产业技术体系的调查统计,我国的生姜栽培面积达20万公顷,年产量超过800万吨,远销南亚、日韩和欧美等世界多个国家及地区^[2]。然而生姜在生长过程中易遭受生物和非生物胁迫,极大地影响了其生长发育和品质产量,制约了产业的可持续发展。

细胞分裂素(CKs, cytokinesis)是存在于植物体内的具有腺嘌呤环结构的一种激素,具有广泛的生物学功能,在植物适应复杂环境变化的过程中发挥着重要的作用^[3],如对生物和非生物胁迫的响应、参与细胞的分裂、控制顶端优势、调节芽的分化和延缓叶片衰老等^[4]。异戊烯基转移酶(IPT, isopentenyl-transferases)是催化细胞分裂素生物合成的关键酶^[5],也是重要的限速酶^[6],其编码基因最早在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中鉴定得到,命名为IPT^[7]。在植物中,IPT以ATP/ADP IPTs和tRNA-IPTs的形式存在,在植物体内IPTs介导ATP/ADP和tRNA两种类型的CKs合成途径^[8]。研究表明,ATP/ADP IPTs控制异戊烯腺嘌呤(iP, isopentenyladenine)型和反式玉米素(tZ, trans-zeatin)型CKs的生物合成,而tRNA IPTs主要参与顺式玉米素(cZ, cis-Zeatin)型CKs的合成^[9]。

IPT作为细胞分裂素生物合成途径中的第一限速酶,在调节植物逆境响应过程中发挥着重要的作用^[10]。tRNA IPTs主要催化tRNA降解产生cZ型细胞分裂素,ATP/ADP IPTs则通过从头合成途径催化tZ和iP型细胞分裂素的合成。由于tZ和iP是植物体内主要的细胞分裂素,且ATP/ADP IPTs能够响应多种信号从而调控细胞分裂素含量,所以Miyawaki

等^[11]认为ATP/ADP IPTs对于植物细胞分裂素的合成更为重要。IPT参与了细胞分裂素合成过程中的第一步,并在这关键一步中发挥重要作用。在拟南芥中,*AtIPT1*和*AtIPT3~AtIPT8*编码ATP/ADP IPTs,另外两个*AtIPT*基因*AtIPT2*和*AtIPT9*编码tRNA IPTs^[12]。

到目前为止,IPT基因已经在许多植物中被鉴定,其中包括拟南芥^[13]、水稻^[14]、番茄^[15]和大豆^[16]等,但缺乏对生姜IPTs家族成员的系统分析。本研究采用生物信息学的方法对生姜IPT基因家族所有成员进行鉴定,对其基因结构、进化关系、保守基序、共线性关系、顺式作用元件、基因表达模式等进行了分析,并通过分析qRT-PCR结果,有助于进一步明确*ZoIPT*家族成员的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 *ZoIPT*基因家族成员的鉴定及系统发育树的构建

生姜基因组数据由长江大学香辛作物研究院提供^[17]。以拟南芥(<https://www.arabidopsis.org/>)、水稻(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、小麦(<http://www.maizesequence.org/index.html>)IPT蛋白序列为种子序列,使用BLAST搜索生姜蛋白序列数据库进行同源比对(e-value < 10⁻¹⁰)。在Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org>)下载含有IPT保守结构域的隐马尔科夫模型(PF01715),使用HMMER(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>)和InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>),对候选序列进行验证,去除重复、冗余、注释不完整的氨基酸序列,得到生姜IPT蛋白序列文件,最后利用NCBI的保守结构域数据库(CDD)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)对候选基因的蛋白结构域再次进行鉴定,去除不包含IPT结构域的氨基酸序列,最终获得10个*ZoIPT*基

因家族成员集合。

将经过序列比对和结构域筛选后的 10 个生姜 IPT 蛋白序列与 10 个水稻、9 个拟南芥和 25 个小麦 IPT 序列, 用 ClustalW2 软件, 通过邻接法 (Neighbor-Joining, replicated-bootstraps 1000), 对 *ZoIPT* 序列进行多序列比对 (MSA, multiple sequence alignment)^[18]。使用 iTOL 工具 (Interactive tree of life, <http://ITOL.embl.de>) 绘制 *ZoIPT* 基因的系统发育树。

1.2 ZoIPT 蛋白质特征分析

使用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *ZoIPT* 蛋白的理化性质, 包括其氨基酸长度、亲水性、分子量、不稳定指数、原子总数和等电点。利用 Piant-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Plant_multi) 预测 *ZoIPT* 的亚细胞定位^[19]。使用 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对生姜 *ZoIPT* 基因家族成员的二级结构进行分析对比, 使用 phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) 软件进行三维同源性预测建模。

1.3 ZoIPT 染色体定位和共线性分析

根据生姜基因组的注释信息, 使用 TBtools 获取 *ZoIPT* 家族成员染色体的位置信息, 通过 TBtools 的 BLAST 和 MCScanX 功能对生姜基因组自身序列进行比对, 分析生姜基因串联重复与片段重复关系, 并绘制 *ZoIPT* 基因染色体定位图。通过 TBtools 的 MCScanX 和 gene position extrack 功能对生姜基因组蛋白序列进行比对, 得到生姜物种内的共线性关系, 通过 fasta stasts 功能得到染色体长度文件。用共线性关系文件、染色体长度文件在 TBtools 的 Advanced Circos 功能区绘制 *ZoIPT* 物种内的同源基

因图。

1.4 ZoIPT 基因结构和 Motif 分析

从生姜基因组 GFF3 文件中提取生姜 *ZoIPT* 基因家族成员的基因注释, 利用 TBtools 对生姜 10 个 IPT 进行基因结构分析, 在线分析生姜 IPT 基因家族成员的外显子和内含子的组成; 使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线网站对 10 个 *ZoIPTs* 进行 motif 分析, 识别参数如下: 每个序列包含任意数量的非重叠基序, 不同基序的最大数量为 10 个, 基序长度为 6~50 个碱基不等。结果采用 TBtools 软件 (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 绘制。

1.5 启动子顺式元件分析

使用 Tbtools 软件提取生姜 *ZoIPTs* 基因启动上游 2000 bp 的序列, 并用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 获得 *ZoIPTs* 起始密码子上游 2000 bp 区域的顺式作用元件, 然后将所有的顺式元件按照功能进行分类, 最终通过 TBtools 软件进行可视化。

1.6 表达模式分析

从 NCBI 收集生姜各个生长时期、生物胁迫及非生物胁迫相关转录组数据^[17,20-21], 通过 Cufflinks 计算 *ZoIPTs* 的表达水平 (用标准化的 FPKM 值表示), 并使用 \log_2 (FPKM+1) 值, 通过 TBtools 的 HeatMap 功能绘制 *ZoIPTs* 基因在不同生长时期、组织和处理下的表达热图 (表 1)。

1.7 样品处理

以竹根姜 (*Zingiber officinale* Roscoe. cv. zhugen) 为试验材料, 姜种由长江大学香辛作物研究院提供。在培养箱中催芽至芽长 1.5 cm 左右后 (25 ℃、相对湿度 65%、光周期为 24 h 黑暗), 挑选

表 1 生姜 RNA-seq 数据来源

Table 1 RNA-seq data sources of ginger

登录号 Accession ID	描述 Description	数据大小 (Gb) Data size	参考文献 Reference
PRJNA788194	生姜根茎发育过程、生姜生长过程中颜色的形成机制	未知	[17]
PRJNA592215	竹根姜红茎内部、绿茎、幼黄根茎和红茎表面 4 个样品, 3 个生物学重复	0.24	—
PRJNA380847	生姜根茎低/高土壤湿度 (LUN 和 HUN) 下用无菌水接种, 生姜根茎在低/高时 (LI 和 HI) 用青枯菌接种 3 d, 3 个生物学重复	未知	[20]
PRJNA380972	高土壤湿度增加生姜中青枯菌感染率, 3 个生物学重复	31.5	[21]
PRJNA911443	低温处理生姜姜苗, 3 个生物学重复	16.8	—

— 代表未发表数据

— means datas that didn't published

出芽一致的姜种,盆栽种植于长江大学西校区玻璃温室(栽培盆上径、底径、高分别为25、21、26 cm)。育苗基质为丹麦品氏托普泥炭土和珍珠岩(体积比1:1),当生姜高度为50 cm左右时,选取长势一致的生姜幼苗进行实验。实验设置4个处理:(1)对照,生姜苗正常管理;(2)盐胁迫,生姜苗用20 g/L NaCl溶液灌根处理3 d;(3)淹水胁迫,生姜苗放置在水面始终高于盆中基质土3 cm的水箱(长为163 cm,宽为118 cm,高49 cm)中3 d;(4)干旱胁迫,姜苗用25% PEG-6000处理7 d。每个取样点设3个生物学重复。每个处理以及对照分别取根系、叶片、根茎的样品,液氮速冻后于-80 ℃冰箱中保存直至使用。

表2 生姜 *ZoIPT* 基因家族表达分析的实时荧光定量引物

Table2 RT-qPCR primers for expression on analysis of *ZoIPT* genes in ginger

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>ZoIPT1</i>	AAGTGC GGAAGATGGAGCG	TGGCGTCGTTTAGGAAATGCT
<i>ZoIPT2</i>	TGCTGCTTCCTGTGGGTGG	GATCTCGTCGAGTGCTTCCTCC
<i>ZoIPT3</i>	CGCCAGGAGATTCGACCAGC	CGTCCACCCACAGGAAGCAG
<i>ZoIPT4</i>	GGTGC GGAAGATCGACAAACTA	CCACGTCACTCCTCCAGGGT
<i>ZoIPT5</i>	CCCTGTGCGGGCTGGAACCTA	CCGAAGCGGACTCGTCTTGT
<i>ZoIPT6</i>	TGACATTGGTCTTCGTCCCG	TGGCTGGCTGATGCTGGGT
<i>ZoIPT7</i>	GTGGACCGCATGGTGGCTAG	TGCAAGAAATCGGCAACAAAGT
<i>ZoIPT8</i>	GCTAACGTGCTGTCAGCTTCAGA	GCAACGGGCTCATTAGTCAACG
<i>ZoIPT9</i>	GTGGAGCAGGTGCGGAAGA	CAAGGTGCAGACGGGAGGTT
<i>ZoIPT10</i>	AATCGCACAGACGAAGGT	AGGAATGGGCTCACAAGA
<i>ZoRBP</i>	CCTATGAAGCGTAGAAACACAAG	GGAAGGACAACATCCCAAATC

2 结果与分析

2.1 *ZoIPT* 的鉴定及系统发育分析

为鉴定 *ZoIPTs* 基因,对生姜基因组的蛋白序列进行本地BLAST搜索,去除重复、冗余、注释不完整和不包含IPT结构域的序列后,从生姜基因组数据库中共鉴定出10个编码包含IPT结构域(PF01715)的 *ZoIPT* 成员。根据系统发育树所示的进化关系,将它们分别命名为 *ZoIPT1*~*ZoIPT10*。根据序列的相似性和拓扑结构将 *ZoIPT* 基因家族归类为6个亚群(I、II、III、IV、V、VI)(图1)。

2.2 *ZoIPT* 蛋白质特征分析

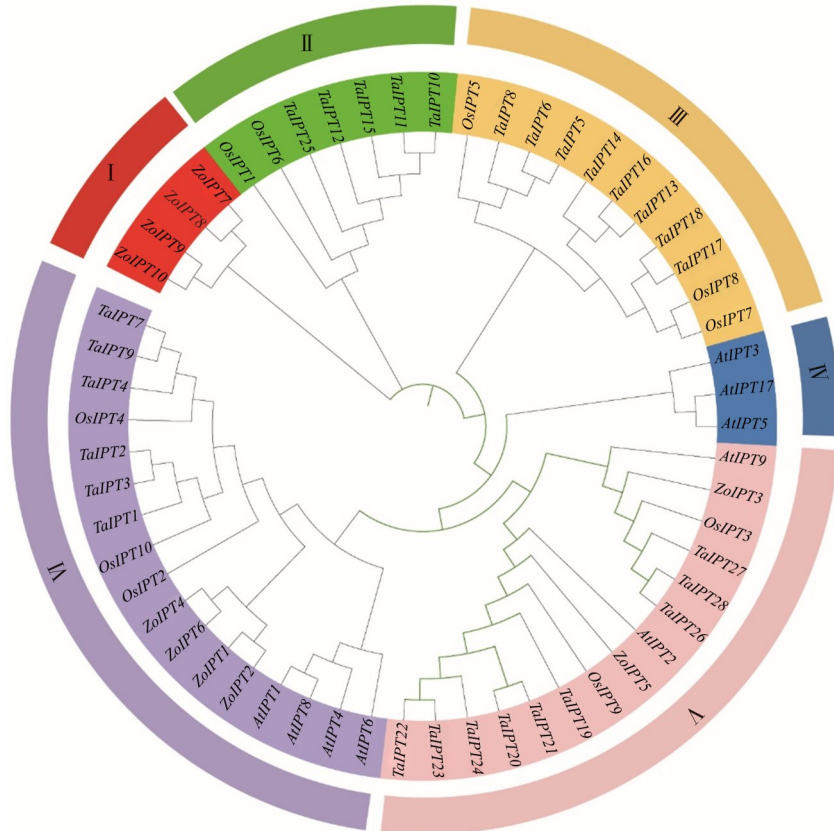
ZoIPT 蛋白质理化性质的基本信息如表3所示,蛋白质平均长度为366 aa,分布范围在283~491 aa之间;蛋白质理论等电点平均值为pI= 7.385,

1.8 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)表达分析

使用TRizol试剂(GenStar,北京,中国)提取总RNA,使用DNaseI(TaKaRa,大连,中国)去除DNA。利用RevertAid逆转录酶(Vazyme,南京,中国)将RNA反转录合成cDNA。利用PrimerPremier5软件设计 *ZoIPT* 基因特异性引物(表2),引物由生工生物工程(武汉)股份有限公司合成。以 *RBP* 基因作为内参^[22],使用SYBR qPCR Master Mix(Vazyme,南京,中国)进行RT-qPCR检测。反应体系为20 μL:正、反向引物各0.4 μL,10 μL SYBR qPCR Master Mix,2.5 μL cDNA,ddH₂O补足至20 μL。扩增程序:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性5 s,58 ℃退火加荧光信号采集30 s,循环40次。使用2^{-ΔΔCt}方法测定相对表达水平^[23]。

分布范围在4.97~9.37之间;蛋白平均分子量为40.31 kDa,分子质量在31.14~54.02 kDa。蛋白质不稳定系数小于40属于稳定蛋白,不稳定系数大于40属于不稳定蛋白,该家族大部分成员不稳定系数大于40,即为不稳定蛋白。亲水性在-0.464~-0.060之间,均为亲水性蛋白。亚细胞定位预测分析发现,8个 *ZoIPT* 分布在叶绿体中,1个分布在线粒体,1个分布在细胞质中。

ZoIPTs 基因家族成员的二级结构完整,其中α螺旋的占比最大,达到了47.40%~61.17%,其次是无规则卷曲,达到了22.98%~37.92%,β转角的占比最少,仅占整体结构的4.29%~8.31%(表4)。三级结构预测结果表明, *ZoIPT* 蛋白结构包括α-螺旋、β-转角、延伸链和随机卷曲(图2), *ZoIPT4*~*7* 结构相似,只是在C端存在微小的结构差异。



不同颜色代表不同的亚家族;ZoIPT:生姜 IPT 基因; AtIPT:拟南芥 IPT 基因; OsIPT:水稻 IPT 基因;TaIPT:小麦 IPT 基因
Different colors represent different subfamilies;ZoIPT means IPT gene in *Zingiber officinale* Roscoe.; AtIPT means IPT gene in *Arabidopsis thaliana*.; OsIPT means IPT gene in *Oryza sativa* L.;TaIPT means IPT gene in *Triticum aestivum* L.

图1 生姜、拟南芥、小麦和水稻 IPT 成员的系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic tree of IPT gene in *Zingiber officinale* Roscoe., *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* L. and *Oryza sativa* L.

表3 生姜IPT 基因家族成员信息及理化性质

Table 3 Information and physicochemical properties of ginger IPT gene family members

名称 Name	基因 ID Gene ID	长度(aa) Length	分子量(kDa) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	亲水性 GRAVY	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
ZoIPT1	Maker00010921	355	38.244	8.14	44.81	-0.121	叶绿体
ZoIPT2	Maker00034555	333	36.115	8.16	77.51	-0.273	叶绿体
ZoIPT3	Maker00055428	443	50.515	7.67	79.28	-0.464	线粒体
ZoIPT4	Maker00069802	349	37.949	9.08	86.99	-0.104	叶绿体
ZoIPT5	Maker00078445	467	52.656	6.52	83.85	-0.426	叶绿体
ZoIPT6	Maker00036588	323	35.064	9.37	87.28	-0.214	叶绿体
ZoIPT7	Maker00057895	308	33.618	5.50	87.40	-0.060	叶绿体
ZoIPT8	Maker00057589	283	31.147	4.97	89.61	-0.161	细胞质
ZoIPT9	Maker00015727	309	33.769	5.16	33.19	-0.142	叶绿体
ZoIPT10	Maker00040052	491	54.025	9.28	93.42	-0.116	叶绿体
平均值 Average		366	40.310	7.39	76.33	0.208	

Length: Length of amino acid; GRAVY: Grand average of hydropathicity

表 4 ZoIPT 二级结构分析

Table 4 Analysis of secondary structure of ZoIPT (%)

名称 Name	α 螺旋 α -Helix	延伸链 Extended chain	β 转角 β -Corner	无规则卷曲 Random curl
ZoIPT1	50.42	12.11	6.48	30.99
ZoIPT2	48.95	12.01	7.81	31.23
ZoIPT3	47.40	10.38	4.29	37.92
ZoIPT4	52.44	14.04	8.31	25.21
ZoIPT5	49.68	11.13	5.57	33.62
ZoIPT6	48.92	13.00	8.05	30.03
ZoIPT7	53.00	8.48	8.13	30.39
ZoIPT8	54.55	12.34	6.49	26.62
ZoIPT9	61.17	10.03	5.83	22.98
ZoIPT10	51.32	11.81	5.30	31.57

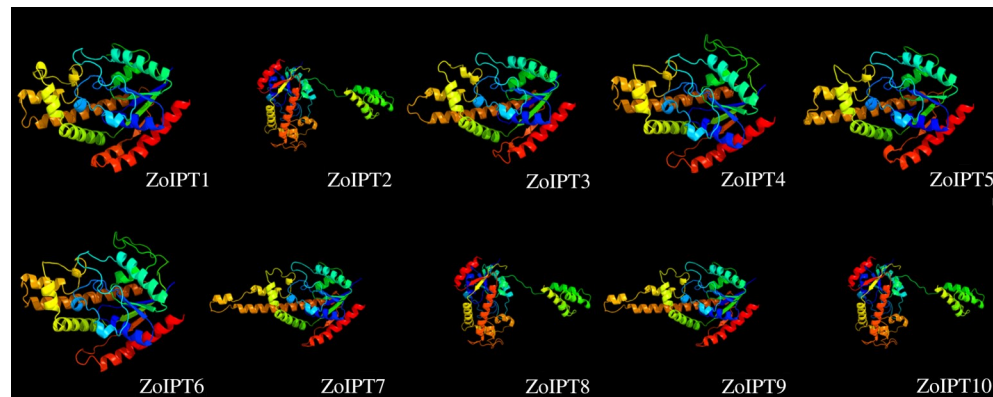


图 2 ZoIPT 三级蛋白结构预测

Fig.2 Prediction of protein tertiary structure of ZoIPT

2.3 染色体定位和共线性分析

如图 3 所示,10 个 *ZoIPTs* 分别位于 7 条不同的染色体上。*ZoIPT1* 位于第 2 条染色体上,*ZoIPT2* 和 *ZoIPT3* 位于第 6 条染色体上,*ZoIPT4* 位于第 8 条染色体上,*ZoIPT5* 位于第 12 条染色体上,*ZoIPT6* 位于第 14 条染色体上,*ZoIPT7* 和 *ZoIPT8* 位于第 18 条染色体上,*ZoIPT9* 和 *ZoIPT10* 位于第 22 条染色体上。第 6 条、第 18 条和第 22 条染色体上的基因数量相等,均有两个基因,第 2 条染色体、第 8 条染色体、第 12 条染色体和第 14 条染色体上只有一个基因。

利用 TBtools 的 MCSanX 功能分析 *ZoIPT* 家族成员的共线性关系,结果如图 4 所示,共有 2 对基因出现片段重复,分别是 *ZoIPT4* 与 *ZoIPT6*、*ZoIPT9* 与 *ZoIPT10*。

为进一步分析生姜 *ZoIPT* 家族的基因进化关系,利用拟南芥、芭蕉 *IPT* 基因家族进行物种间共线性分析(图 5),发现有 6 个生姜 *IPT* 基因(*ZoIPT2*、

ZoIPT4、*ZoIPT6*、*ZoIPT8*、*ZoIPT9*、*ZoIPT10*)与 15 个芭蕉 *IPT* 基因存在共线性,*ZoIPT4* 与 1 个拟南芥 *IPT* 基因存在共线性。表明生姜 *IPT* 基因家族与芭蕉 *IPT* 基因家族同源性高。

2.4 ZoIPT 基因结构分析和 Motif 分析

根据基因组中 GFF3 结构注释信息,使用 Tbtools 绘制 *ZoIPTs* 的外显子/内含子结构图。所有的 *ZoIPTs* 基因家族成员均包含内含子,但只有 *ZoIPT5* 包含 2 个 UTR 非编码区域(图 6B)。保守基序分析发现,从 *ZoIPTs* 中鉴定到 10 个 Motif,其中 *ZoIPT3* 含有的 Motif 最少,为 4 个;*ZoIPT1* 和 *ZoIPT2* 含有的 Motif 最多,为 10 个;结合系统发育分析发现,同一分组的 *ZoIPTs* 含有相似的 Motif 数量(图 6A、C)。

2.5 ZoIPT 基因顺式元件分析

从 10 个 *ZoIPTs* 基因上游的启动子区域共鉴定到 54 类顺式作用元件,这些顺式作用元件分为 3

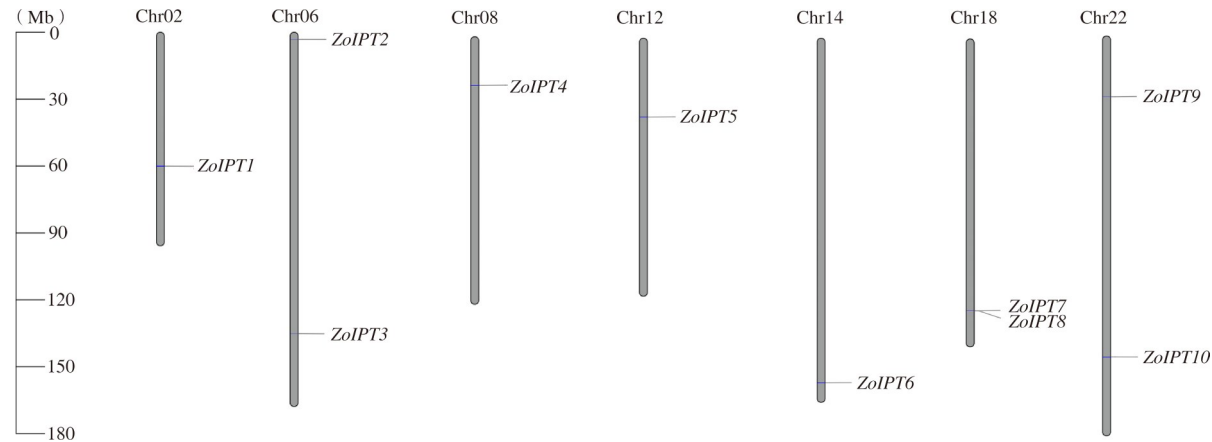
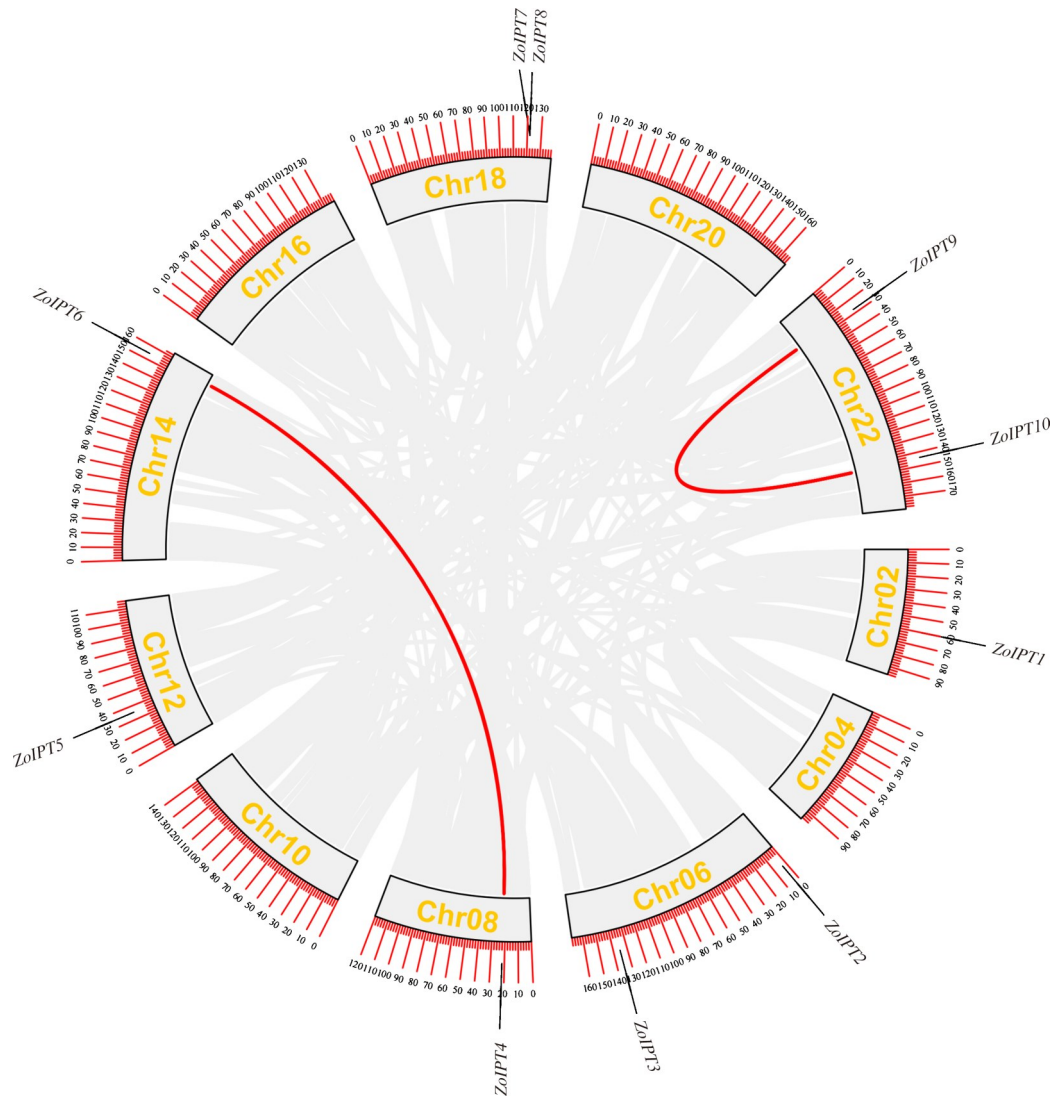


图3 *ZoIPT*基因家族染色体分布

Fig.3 Chromosomal localization of *ZoIPT* gene family from ginger



红线为片段复制的基因对,灰线为生姜基因组中的所有共线性块,染色体内侧对应色块为基因密度的两种不同显示方式
The red lines are the gene pairs copied in large fragments, and the gray lines are all the collinear blocks in the ginger genome.
Two different display modes of gene density corresponding to the color block on the inner side of chromosome

图4 *ZoIPT*物种内的共线性分析

Fig.4 Syntenic relationships analysis of *ZoIPT* gene family from ginger

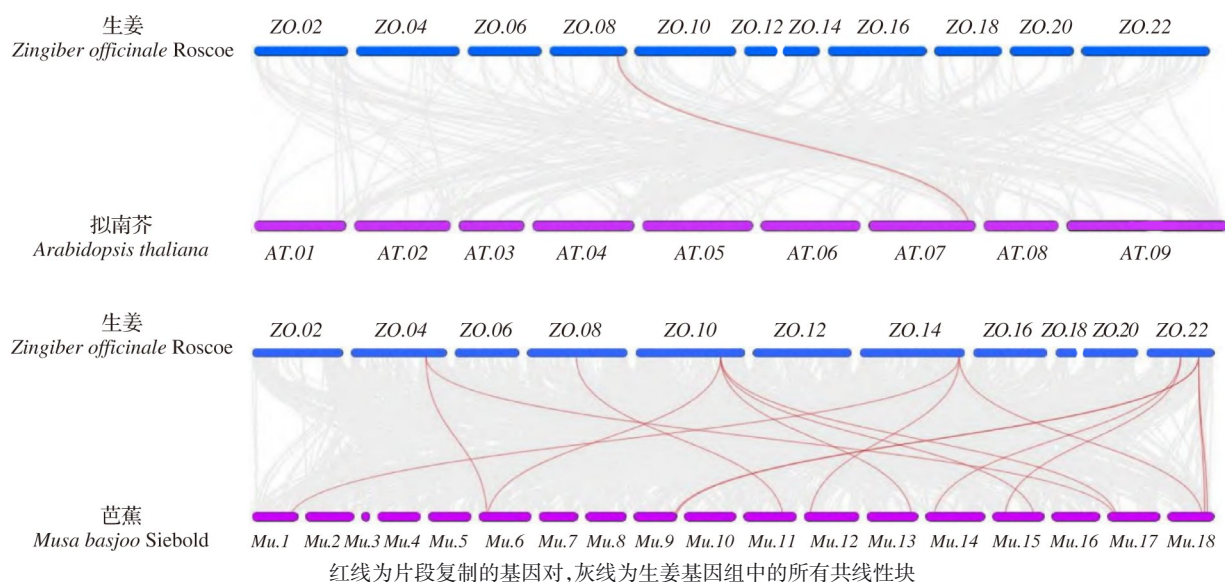


图5 生姜与拟南芥、芭蕉物种间IPT基因的共线性分析

Fig.5 Collinearity analysis of IPT gene among ginger, Arabidopsis and Musa basjoo species

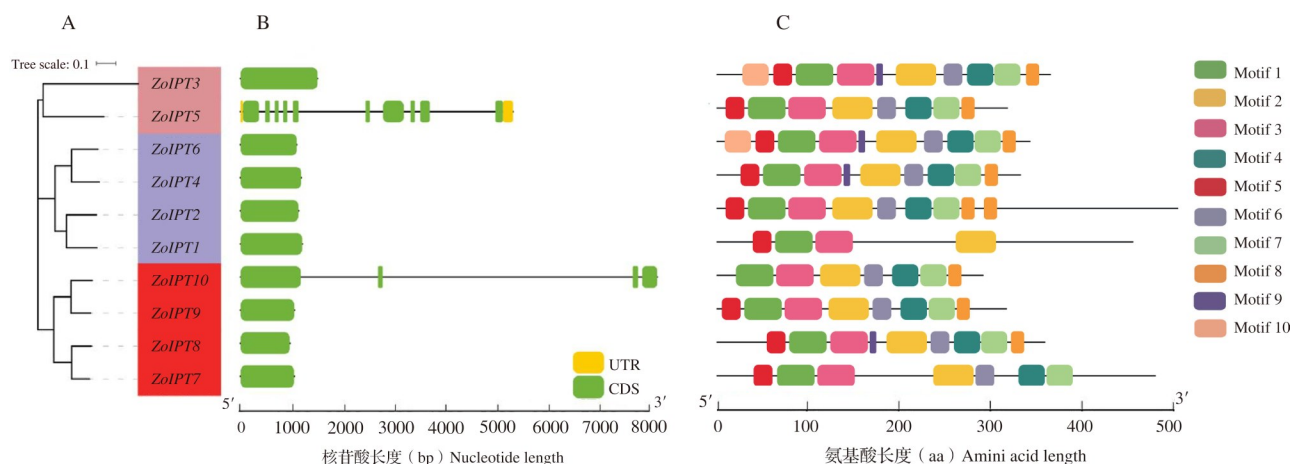


图6 ZoIPT基因家族进化树(A)、基因结构(B)和保守元件分析(C)

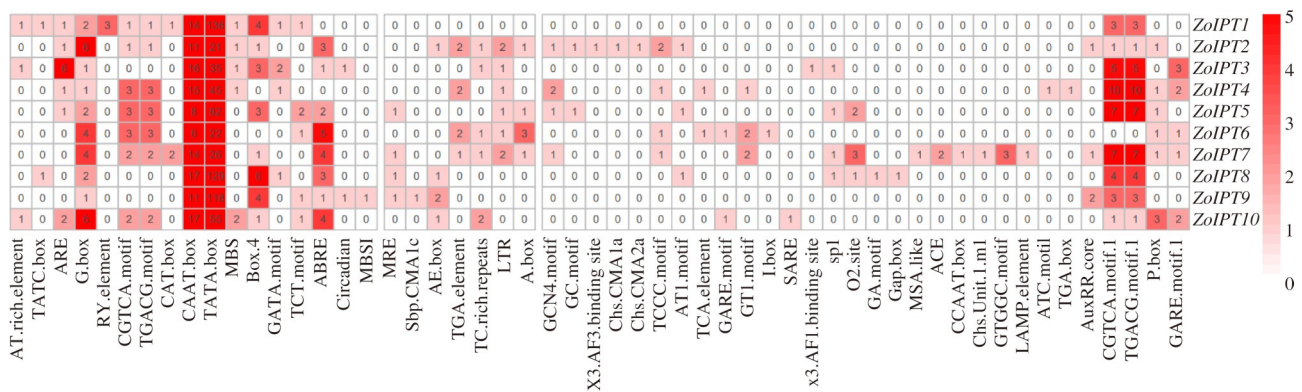
Fig.6 Analysis of evolutionary tree (A), gene structure (B) and conserved motif elements (C) of ZoIPT gene family

组:7类顺式作用元件与生长发育相关,17类与植物激素相关,30类与生物/非生物胁迫相关。其中关于激素响应元件,包括茉莉酸甲酯(CGTCA.motif、TGACG.motif)、脱落酸(ABRE)、生长素(TGA.element、AuxRR.core)、水杨酸(TCA.element)、赤霉素(TATC.box)。关于逆境胁迫和环境应激响应元件,包括厌氧诱导(ARE、GC.motif)、低温(LTR)、干旱(MBS)、参与防御和压力反应(TC.rich. repeats)等。10个ZoIPTs均含有顺式元件,其中TATA.box数量最多,共有669个,存在于每一个ZoIPTs家族成员中。此外,激素响应元件中,茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA.motif和TCACG.motif)数量最多,为41

个。逆境响应元件中,低温(LTR)响应元件最多,为8个(图7)。

2.6 ZoIPT基因表达模式分析

如图8所示,表达谱分析结果显示,ZoIPT基因在不同组织和不同处理下具有不同的表达模式。ZoIPT3和ZoIPT5在90 d的茎、根、叶、根茎中均有较高的表达水平,但ZoIPT2、ZoIPT4、ZoIPT6、ZoIPT8、ZoIPT9、ZoIPT10在这几种组织几乎不表达,大部分ZoIPT基因在根、叶、茎中的表达水平比根茎要高(图8B)。同时ZoIPT3和ZoIPT5在常温、常温下加褪黑素处理、低温处理以及低温加褪黑素处理中表达水平较高,ZoIPT2在低温和低温+褪黑

图7 *ZoIPT*基因启动子上游2 kb顺式作用元件的数量分析Fig.7 Putative cis-acting existed in the 2 kb upstream region of *ZoIPT* gene family

素中表达较高,而 *ZoIPT1*、*ZoIPT4*、*ZoIPT6*、*ZoIPT7*、*ZoIPT8*、*ZoIPT9*、*ZoIPT10* 则表达水平较低,加褪黑素处理后的表达水平略高于不加褪黑素处理的表达水平(图 8C)。*ZoIPT6* 在土壤孔隙水分含量为 10% 和 40% 的条件下分别接种青枯菌和无菌水的环境中均有着较高的表达水平,但在 40% 的条件下表达水平较高,其他基因在 10% 和 40% 的条件下表达水平都较低(图 8D)。*ZoIPT3*、*ZoIPT5*、*ZoIPT9* 在红色外表皮,红色外表皮的内部组织,根茎,绿色的茎中表达水平较高, *ZoIPT1*、*ZoIPT2*、*ZoIPT4*、*ZoIPT6*、*ZoIPT7*、*ZoIPT8*、*ZoIPT10* 在这些组织中几乎不表达(图 8E)。*ZoIPT5* 和 *ZoIPT9* 在接种腐皮镰刀菌和接种腐皮镰刀菌+壳聚糖的处理中有着较高的表达水平, *ZoIPT1*、*ZoIPT2*、*ZoIPT4*、*ZoIPT6*、*ZoIPT7*、*ZoIPT8*、*ZoIPT10* 表达水平较低,几乎不表达(图 8F)。*ZoIPT5* 在 4℃、12℃ 以及 25℃ 不同温度处理下有着较高的表达水平, *ZoIPT2*、*ZoIPT4*、*ZoIPT6* 表现出较低的表达水平,而 *ZoIPT7*、*ZoIPT8*、*ZoIPT9*、*ZoIPT10* 基本不表达(图 8G)。*ZoIPT1*、*ZoIPT3*、*ZoIPT5*、*ZoIPT7*、*ZoIPT9* 在根茎的 5 个发育阶段中均有着中高表达水平, *ZoIPT9*、*ZoIPT10* 在茎的 5 个发育阶段的表达高于茎和根(图 8H)。

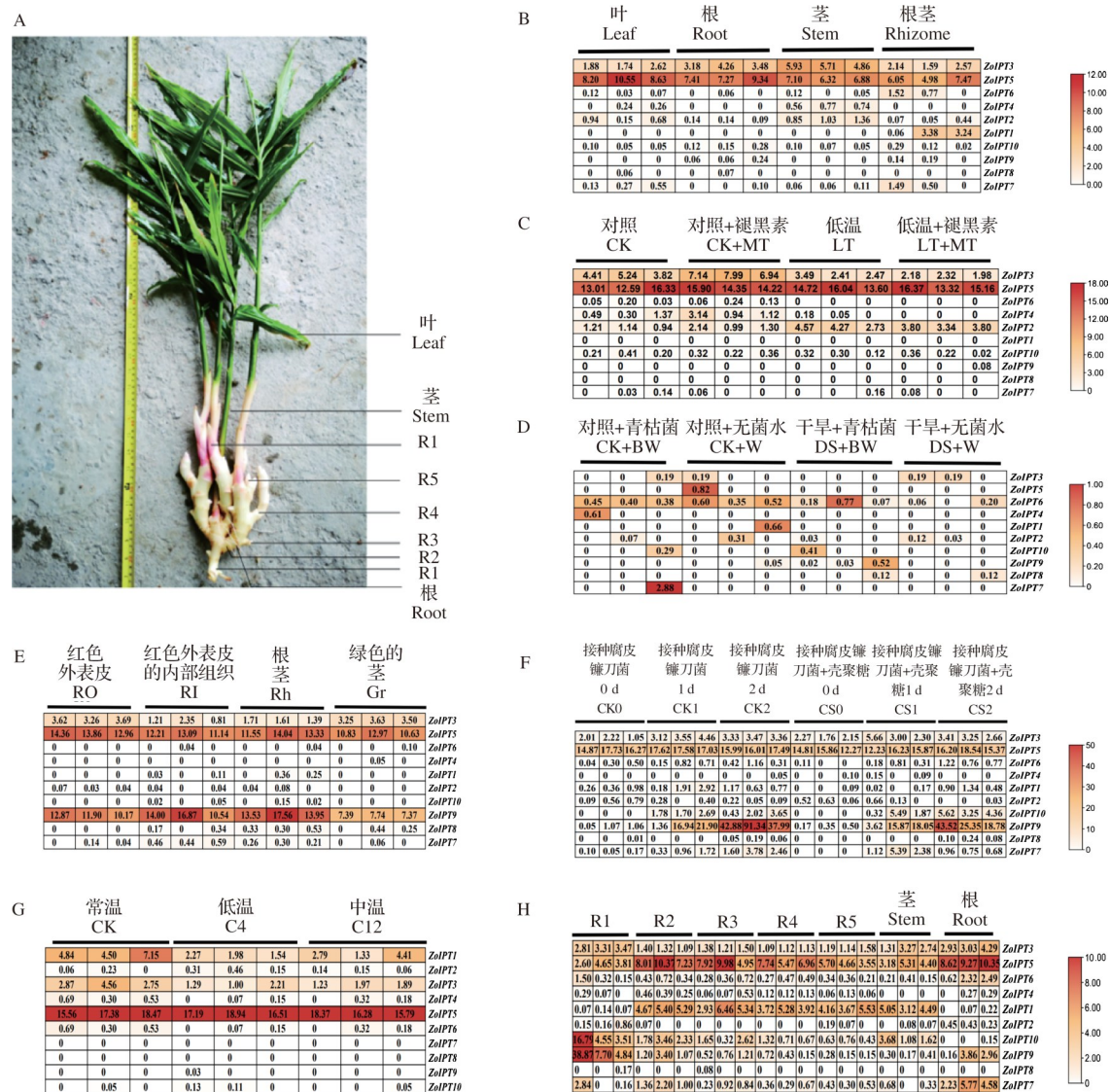
2.7 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)表达分析

为了进一步研究 *ZoIPTs* 在不同胁迫下的表达特征,对 10 个 *ZoIPTs* 在对照处理,干旱处理、淹水处理和盐胁迫处理的叶、根茎以及根系的表达情况进行了 RT-qPCR 分析。

如图 9 所示, *ZoIPT* 在不同组织和不同处理下表达水平存在差异。叶片中,同对照相比, *ZoIPT1* 在干旱和淹水胁迫下的表达水平上升,分别显著上调到 2.03 倍和 5.68 倍;同对照相比,在干旱和盐胁迫处理下, *ZoIPT2* 在叶片中表达水平上调,分别显著

上调到 2.69 倍和 1.76 倍;同对照相比, *ZoIPT3* 在干旱和盐胁迫下的表达量显著降低,但淹水胁迫下的表达量却显著上调;同对照相比, *ZoIPT4* 在 3 种胁迫下的表达水平均为下调;同对照相比, *ZoIPT5* 在 3 种胁迫下的表达量显著升高,分别显著上调到 28.7 倍、52.1 倍和 16.8 倍;同对照相比, *ZoIPT6* 表达量较低,在干旱、淹水和盐胁迫下分别显著下调至 15.1%、10.4% 和 3.01%;同对照相比, *ZoIPT7* 在干旱胁迫下表达量较低,显著下调到 62%,淹水胁迫下表达量较高,显著上调到 2.92 倍;同对照相比, *ZoIPT8* 在干旱、淹水和盐胁迫下表达量较低,分别显著下调到 43%、81%、90%;同对照相比, *ZoIPT9* 在 3 种胁迫下表达均较低,干旱和盐胁迫分别显著下调到 61% 和 43%。同对照相比, *ZoIPT10* 在干旱、淹水和盐胁迫 3 种胁迫中表达量上调,分别是原来的 1.19 倍、1.41 倍和 1.82 倍。除了 *ZoIPT6* 在干旱、淹水和盐胁迫胁迫下均表现下调,其他基因在叶片中表现出上调或者下调,突出了不同处理间的差异。

根茎中,同对照相比, *ZoIPT1* 在干旱胁迫下下调表达;同对照相比, *ZoIPT2* 在 3 种胁迫中表达量均为上调;同对照相比, *ZoIPT3* 在淹水和盐胁迫下的表达显著上升,分别为对照的 28.34 倍和 45.28 倍;同对照相比, *ZoIPT4* 在淹水和干旱胁迫下表达量显著上调,分别上调到 23.66 倍和 2.24 倍,但在盐胁迫下表达显著下调,下调到 33%;同对照相比, *ZoIPT5* 在干旱胁迫下表达显著升高,是对照的 34.6 倍,盐胁迫下表达较高,为对照的 3.47 倍;同对照相比, *ZoIPT6* 在淹水胁迫下表达显著上调到 23.69 倍,盐胁迫和干旱胁迫下的表达量也分别显著上调到 1.79 倍和 1.49 倍;同对照相比, *ZoIPT7* 在淹水胁迫中显著上调到 3.44 倍;同对照相比, *ZoIPT8* 在干旱和淹



A: 生姜示意图, 其中R1~R5对应生姜根茎5个发育阶段, R1: 成熟根茎, R2: 母姜, R3: 子姜, R4: 孙姜, R5: 新发育的根茎, 下同; B: *ZolIPT* 在 90 d 的生姜叶、根、茎和根茎中的表达情况; C: *ZolIPT* 基因在生姜叶 25 °C、25 °C + 褪黑素、2 °C、2 °C + 褪黑素处理下的表达情况; D: *ZolIPT* 基因在生姜根茎中 10% 和 40% 土壤孔隙水分含量下接种青枯菌和无菌水处理下的表达情况; E: *ZolIPT* 在红色外表皮、红色外表皮的内部组织和根茎交界处的根茎、绿色的茎的表达情况; F: *ZolIPT* 基因在生姜根茎中接种腐皮镰刀菌和接种腐皮镰刀菌+壳聚糖后不同时间的表达情况;

G: *ZolIPT* 基因在生姜叶片不同温度处理下的表达情况; H: *ZolIPT* 基因在生姜根茎 5 个发育阶段及茎和根中的表达情况

A: Schematic diagram of the ginger, R1-R5 corresponds to 5 developmental stages of ginger rhizomes, R1: Mature rhizomes, R2: The seed of ginger, R3: Young rhizomes, R4: New rhizomes, R5: Newly developed rhizomes, the same as below; B: Expression of *ZolIPT* in ginger roots, stems, leaves and rhizomes under 90 d growth conditions; C: Expression of *ZolIPT* in ginger leaves treated with 25 °C, 25 °C + melatonin, 2 °C, 2 °C + melatonin (LT-MT); CK: Control check, MT: Melatonin, LT: Low temperature; D: Expression of *ZolIPT* in ginger rhizomes after inoculation with bacterial wilt and sterile water at 10% soil water filled porosity and treatment with bacterial wilt and sterile water at 40% soil water filled porosity; CK: 40% soil water filled porosity, DS: 10% soil water filled porosity, BW: Inoculation with bacterial wilt, W: Inoculation with sterile water; E: Expression of *ZolIPT* in red outer epidermis, inner tissue of red outer epidermis, root stem and green stem at the junction of ginger stem and rhizome; RO: Red out epidermis, RI: The internal tissues of the red out epidermis, Rh: Rhizomatic, Gr: Green rhizomatic; F: Expression of *ZolIPT* genes in ginger rhizomes after inoculation with *Fusarium oxysporum* for different times and inoculation with *Fusarium oxysporum* + chitosan for different times; CK0: Inoculation with *Fusarium oxysporum* for 0 d, CK1: Inoculation with *Fusarium oxysporum* for 1 d, CK2: Inoculation with *Fusarium oxysporum* for 2 d, CS0: inoculation with *Fusarium oxysporum* + chitosan for 0 d, CS1: inoculation with *Fusarium oxysporum* + chitosan for 1 d, CS2: inoculation with *Fusarium oxysporum* + chitosan for 2 d; G: Expression of *ZolIPT* at different temperatures in ginger leaves; CK: Expression of *ZolIPT* at 25 °C in ginger leaves, C4: Expression of *ZolIPT* at 4 °C in ginger leaves; C12: Expression of *ZolIPT* at 12 °C in ginger leaves; H: Expression of *ZolIPT* in 5 developmental stages of ginger rhizome (R1-R5) and root and stem of ginger

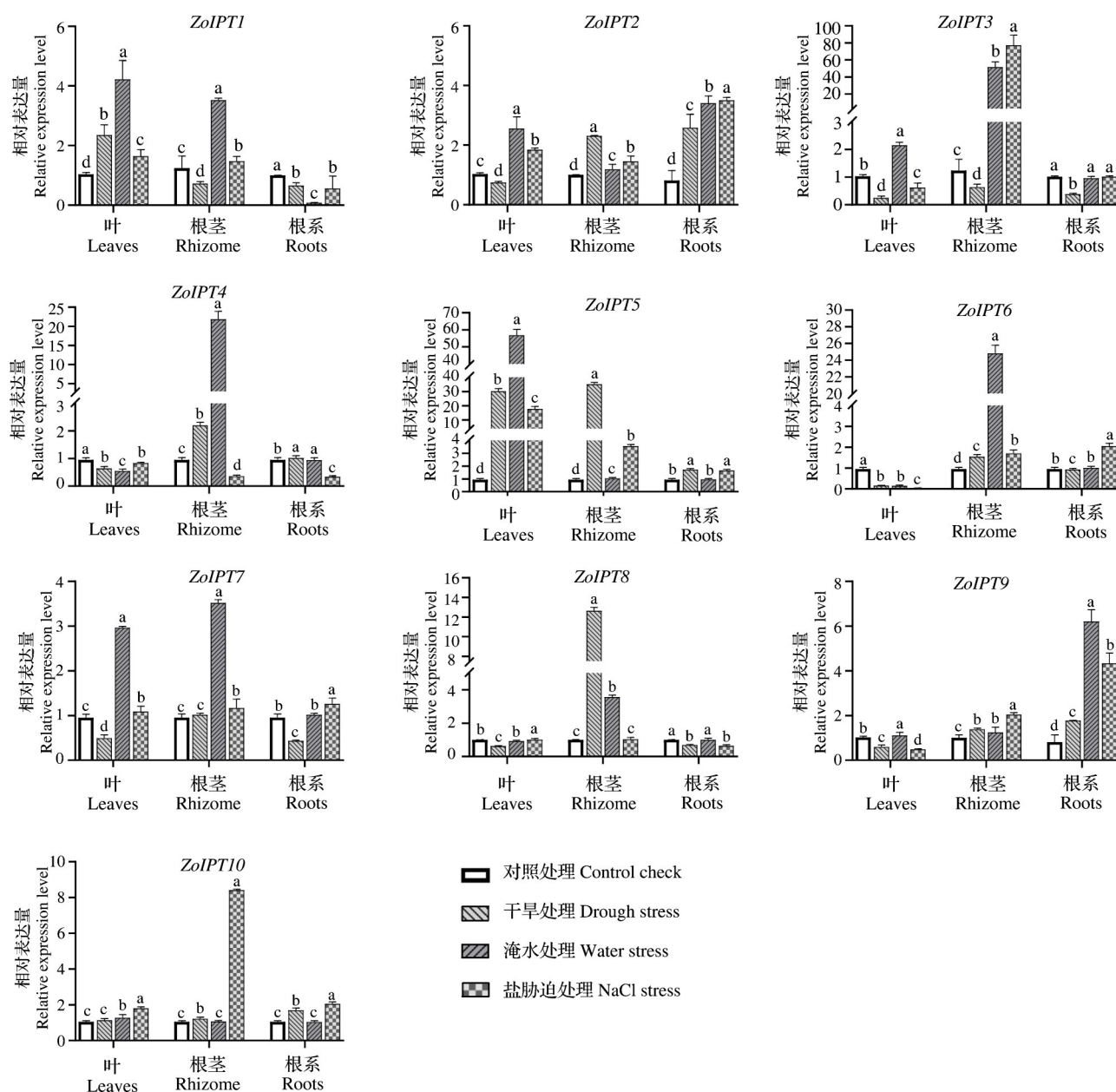
图 8 *ZolIPT* 在生姜不同生育期各器官以及不同处理中的表达情况

Fig.8 *ZolIPT* expression in different organs and different treatments during different reproductive stages of ginger

水胁迫下表达量分别上调到 12.18 倍和 3.46 倍, 盐胁迫下表达量下调到 89%; 同对照相比, *ZoIPT10* 在干旱胁迫下表达水平是对照的 1.24 倍, 在盐胁迫下表达水平较高, 是对照的 8.29 倍。根茎中大部分基因在不同处理下表现出上调, 表明了基因在不同组织间的差异。

在根系中, 同对照相比, *ZoIPT1* 在干旱和淹水

胁迫下表达量均下调; 同对照相比, *ZoIPT2* 在 3 种胁迫中表达量均上调; 同对照相比, *ZoIPT3* 在干旱胁迫下表达水平较低, 为对照的 41.9%; *ZoIPT5* 在干旱和盐胁迫下表达与对照相比较, 分别是对照的 1.68 倍和 1.52 倍; 同对照相比, *ZoIPT10* 在干旱和盐胁迫下表达水平分别是对照的 1.74 倍和 2.09 倍。



图柱上的不同字母代表相同组织不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

The different letters on the graph bar represent significant differences between different treatments of the same organization ($P < 0.05$)

图9 *ZoIPT* 基因的相对表达量

Fig.9 Expression of *ZoIPT* gene members under different stresses

3 讨论

生姜是一种重要的香辛蔬菜作物,其种植过程中容易受到各种生物/非生物胁迫的影响,不利于生姜产业的可持续发展^[24]。IPT在植物生长发育和胁迫应答过程中发挥重要作用,但IPT在生姜中的功能尚不清楚。本研究从生姜全基因组中鉴定了10个ZoIPT基因家族成员(*ZoIPT1*~*ZoIPT10*),其成员数量和拟南芥(9个)、水稻(10个)中相似,但低于小麦(25个)。从基因组大小来看,生姜基因组(405 Mb)大于拟南芥(164 Mb),小于水稻(441 Mb),远低于小麦(13.8 Gb),表明IPT基因家族成员数量可能与基因组大小存在一定的关系。植物基因组越大,包含的IPT基因家族成员数量可能越多。

基因片段复制可能是植物基因家族进化的关键因素,且基因片段的复制可能是植物基因家族扩大的主要原因^[25]。在基因复制之后,复制的基因对可能具有不同的功能^[25]。基因共线性分析结果表明,生姜IPT基因家族存在片段重复事件(图4),且基因片段重复只在8、14和22号染色体上存在。对生姜、拟南芥和芭蕉这3个物种进行了共线性分析,结果表明生姜IPT家族基因分别与15个和1个芭蕉和拟南芥存在共线性关系,推测生姜与芭蕉的IPT基因家族同源性较高。这可能与生姜和芭蕉在进化中起源关系相近有关^[22]。研究表明聚类于同一分支中的*ZoIPT*基因可能行使相近的功能。通过生姜、拟南芥、水稻和小麦4个物种的IPT基因系统发育进化树,可将生姜IPT基因家族分为3个分支(图6)。基因结构分析和Motif分析发现,第2个分支上的两个基因保守基序分布相似,但与第1和第3个分支上基因的保守基序相比存在较大的差异(图6C),推测这两个基因的功能可能相似,且不同于其余*ZoIPT*基因。在小麦IPT基因家族中研究发现,同一分支的TaIPT包含类似的保守基序,但是不同分支TaIPT保守基序的数目及类型各不相同且有特定的基序出现,由此推测进化过程中特定基序的出现可能是TaIPT基因分化出不同功能的重要原因^[26]。类似的,不同分支的*ZoIPT*基因的保守基序的数目及类型也各不相同且有特定基序出现,表明在进化过程中特定基序的出现也可能是*ZoIPT*基因分化出不同功能的重要原因。系统进化分析结果表明,与水稻、小麦相比,*ZoIPT*与AtIPT蛋白的亲缘关系更近,拟南芥中tRNA-IPT(*AtIPT2*、*AtIPT9*)是负责产生cZ型细胞分裂素的基因,鉴于*ZoIPT3*

和*ZoIPT5*与*AtIPT2*、*AtIPT9*聚集在进化树的同一簇,推测*ZoIPT*可能也负责产生cZ型细胞分裂素。

研究表明,大多数IPT定位于质体,但也有些存在于线粒体中^[27]。IPT家族蛋白包含保守的IPPT(PF01715)结构域,但不同的激酶结构域导致IPT蛋白定位不同。研究表明拟南芥、藜麦和小麦IPT家族的大多数IPT蛋白定位于线粒体或质体。如:拟南芥中*AtIPT1*、3、5和8定位于质体,通过质体内甲基赤藓糖醇磷酸(MEP, methylerythritol phosphate)途径产生的类异戊二烯前体(DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate)为前体合成tZ型细胞分裂素;*AtIPT4*定位于细胞质中,*AtIPT7*定位于线粒体,二者通过甲羟戊酸(MVA, mevalonate)途径产生的羟甲基丁烯基二磷酸(HMBDP, hydroxy methyl butenyl diphosphate)为前体合成iP型细胞分裂素^[28];小麦中*TaIPT4*和*TaIPT9*参与cZ型CK的合成^[29]。藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)中,7个*CqIPT*定位于细胞质中,12个*CqIPT*定位于叶绿体上^[30];小麦(*Triticum aestivum* L.)中,8个*TaIPT*定位在叶绿体上,有5个*TaIPT*定位在线粒体上^[28];在生姜中有8个*ZoIPT*定位于叶绿体上,1个定位于细胞质中,1个定位于线粒体。生姜IPT各成员亚细胞定位预测与拟南芥、藜麦、小麦较为相似,这些植物的亚细胞定位预测结果都为大部分成员定位在质体,少部分成员定位于线粒体中,表明生姜IPT蛋白可能在线粒体或质体上发挥作用。

研究表明,IPT基因参与调控植物逆境胁迫的响应。拟南芥中,*AtIPT8*突变体和*AtIPT1*、3、5、7四基因突变体增强了植物的抗盐和抗旱能力^[31]。烟草中,过表达IPT基因,使烟草体内细胞分裂素的浓度增加,提高了烟草植株的耐旱性^[32]。水稻中过表达IPT基因,增强了水稻的耐旱性^[33]。顺式调控序列的识别和表征及其在调控发育、完成环境响应等方面的功能研究对植物学至关重要^[34]。顺式作用元件分析结果表明,*ZoIPT*基因家族成员启动子区域的54种顺式作用元件按照其功能可大致分成3类,分别是生物/非生物胁迫、生长发育以及植物激素反应相关的元件(图7);其中生物/非生物胁迫相关的顺式作用元件种类最多,类似的,在小麦和桃IPT基因中也是响应生物/非生物胁迫相关的顺式作用元件种类占比最大^[28,35],这些元件一定程度上影响和参与了调控*ZoIPT*对外界环境胁迫的响应。诱导型启动子指在某些特定的刺激下,该种类型的启动子可以大幅度地提高下游基因的转录水平,其中

赤霉素(GA)响应相关的元件是诱导型启动子的重要元件^[36]。有研究表明赤霉素在植物受到生物(如昆虫、真菌激发子等)和非生物(如干旱、高盐 and 低温等)胁迫时,可作为信号分子诱导相关抗逆基因的表达,从而增强植物的抗逆性^[37]。本研究中,*ZoIPT* 基因家族启动子区域大量检测到赤霉素(GA)反应相关的元件(TATC.box)和 MEJA 响应元件(TGACG.motif, CGTCA.motif),因此推测生姜 IPT 家族成员可能参与植物的逆境响应。

为更好地解析 *ZoIPT* 基因的表达水平,借助已经发表的 RNA-seq 数据,对 10 个 *ZoIPT* 基因表达水平和表达模式进行了初步分析,发现大部分 *ZoIPT* 成员均能正常表达,但 *ZoIPT* 在不同组织和根茎的不同发育阶段中的表达量差别较大,具有组织特异性。其中 *ZoIPT3* 和 *ZoIPT5* 在生姜的不同生长时期和不同胁迫处理中均有较高的表达水平,推测这两个基因在生姜不同生长时期和响应外界胁迫中均发挥作用。*ZoIPT9* 在各组织中表达较低,但在接种腐皮镰刀菌和接种腐皮镰刀菌+壳聚糖两种处理中有着较高的表达水平,推测该基因在未受胁迫刺激时表达量较低,但是接种腐皮镰刀菌后,该基因被诱导表达,表明其表达受到腐皮镰刀菌侵染的诱导。

盐胁迫、干旱、涝害等是农业生产常见的非生物胁迫。研究表明,盐胁迫可导致拟南芥体内细胞分裂素含量降低,进而增强植株对盐胁迫的耐受性^[31];拟南芥 *AtIPT8* 过量表达后,植株活性氧含量增加,同时对盐胁迫的耐受性降低^[38];茎瘤芥可以通过抑制 IPT 的表达来减少植株体内细胞分裂素合成,从而响应盐胁迫^[39]。为了进一步验证 *ZoIPT* 基因在生姜遭受非生物胁迫下的表达模式,对 10 个 *ZoIPT* 基因在干旱、涝害和盐胁迫下生姜不同组织中的表达情况进行了分析,结果表明,在叶片中同对照相比 *ZoIPT1* 和 *ZoIPT5* 在干旱和淹水胁迫下表达量显著上调。在根茎中,与对照相比,*ZoIPT1/3* 在干旱胁迫下表达量显著下调,表明这些基因可能参与响应了干旱胁迫;*ZoIPT4/6/7/8/10* 在淹水胁迫下表达量显著上调,表明这些基因可能参与响应了淹水胁迫;在根系组织中,与对照相比,*ZoIPT2/9* 在干旱胁迫下表达量显著上调,说明这些基因可能参与响应干旱胁迫。总之,这 10 个 *ZoIPTs* 基因都响应了不同程度的非生物胁迫,表明 *ZoIPT* 基因家族成员能够响应不同程度的环境刺激,但 *ZoIPTs* 基因在响应不同非生物胁迫时的具体表达模式有待进一

步探究。

综上所述,本研究从生姜中共鉴定到 10 个 *ZoIPTs* 家族基因,对 *ZoIPTs* 基因家族成员的结构、分类、进化和表达模式等进行了初步分析,推测 *ZoIPTs* 基因特别是 *ZoIPT3* 和 *ZoIPT5* 可能在生姜抵御生物与非生物胁迫方面发挥着关键的作用,为进一步提高生姜的抗逆性提供了理论基础。

参考文献

- [1] Varakumar S, Umesh K V, Singhal R S. Enhanced extraction of oleoresin from ginger (*Zingiber officinale*) rhizome powder using enzyme-assisted three phase partitioning. *Food Chemistry*, 2017, 216:27-36
- [2] 任清盛, 李承永. 我国生姜产业现状及发展分析. *中国蔬菜*, 2021, 8:8-11
Ren Q S, Li C Y. Analysis of the current situation and development of China's ginger industry. *China Vegetables*, 2021, 8:8-11
- [3] Crowell D N, Salaz M S. Inhibition of growth of cultured tobacco cells at low concentrations of lovastatin is reversed by cytokinin. *Journal of Plant Physiology*, 1992, 100(4): 2090-2095
- [4] Argueso C T, Ferreira F J, Eppele P, To J P, Hutchison C E, Schaller G E, Dangl J L, Kieber J J. Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetics*, 2012(1):e1002448
- [5] Chen C, Melitz D K. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS Letters*, 1979, 107(1): 15-20
- [6] Blackwell J R, Horgan R. Cytokinin biosynthesis by extracts of *Zea mays*. *Phytochemistry*, 1994, 35(2):339-342
- [7] Barry G F, Rogers S G, Fraley R T, Brand L. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81:4776-4780
- [8] Akiyoshi D E, Klee H, Amasino R M, Nester E W, Gordon M P. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81:5994-5998
- [9] Sakakibara H. Cytokinins activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 431-449
- [10] Frebort I, Kowalska M, Hluska T, Frebortova J, Galuszka P. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62:2431-2452
- [11] Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(44):16598-16603

- [12] Gujjar R S, Supaibulwatana K. The Mode of cytokinin functions assisting plant adaptations to osmotic stresses. *Plants*; Basel, 2019, 8(12):542
- [13] Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada, Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59:75-83
- [14] Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, Yamamoto Y, Naagasaki H, Inukai Y, Sato Y, Matsuoka M. Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology*, 2006, 142:54-62
- [15] Satoshi M, Kaori K, Machiko F, Ichiro H, Shunsuke I. Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15):5569-5579
- [16] Ye C J, Wu S W, Kong F N, Zhou C J, Yang Q K, Sun Y, Wang B. Identification and characterization of an isopentenyl transferase (*IPT*) gene in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Science*, 2006, 170:542-550
- [17] Li H L, W L, Dong Z M, Jiang Y S, Jiang S J, Xing H T, Li Q, Liu G C, Tian S M, Wu Z Y, Wu B, Li Z X, Zhao P, Zhang Y, Tang J M, Xu J B, Huang K, Liu X, Zhang W L, Liao Q H, Ren Y, Huang X Z, Li Q Z, Li C Y, Wang Y, Baskaran Xavier-Ravi, Li H H, Liu Y, Wan T, Liu Q H, Zou Y, Jian J B, Xia Q Y, Liu Y Q. Haplotype-resolved genome of diploid ginger (*Zingiber officinale*) and its unique gingerol biosynthetic pathway. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):242
- [18] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22):4673-4680
- [19] Sharma H, Sharma A, Rajput R, Sidhu S, Dhillon H, Verma P C, Pandey A, Upadhyay S K. Molecular characterization, evolutionary analysis, and expression profiling of *BOR* genes in important cereals. *Plants*, 2022, 11(7):911
- [20] Jiang Y S, Huang M J, Zhang M X, Lan J B, Wang W X, Tao X, Liu Y Q. Transcriptome analysis provides novel insights into high-soil-moisture-elevated susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Southwest). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 132:547-556
- [21] Huang M J, Xing H T, Li Z X, Li H L, Wu L, Jiang Y S. Identification and expression profile of the soil moisture and *Ralstonia solanacearum* response CYPome in ginger (*Zingiber officinale*). *PeerJ*, 2021, 9:11755
- [22] Li G, Ma J W, Yin J L, Guo F L, Xi K Y, Yang P H, Cai X D, Jia Q, Li L, Liu Y Q, Zhu Y X. Identification of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR analysis of ginger under abiotic stress and for postharvest biology studies. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1587
- [23] Yin J L, Liu M Y, Ma D F, Wu J W, Li S L, Zhu Y X, Han B. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136:90-98
- [24] Varakumar S, Umesh K V, Singhal R S. Enhanced extraction of oleoresin from ginger (*Zingiber officinale*) rhizome powder using enzyme-assisted three phase partitioning. *Food Chemistry*, 2017, 216:27-36
- [25] 陈小晶, 王东梅, 关红辉, 郭剑, 沙小茜, 李永祥, 张登峰, 刘旭洋, 何冠华, 石云素. 玉米 CIPK 基因家族的鉴定及 ZmCIPK3 的抗旱性功能研究. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4):1064-1075
Chen X J, Wang D M, Guan H H, Guo J, Sha X X, Li Y X, Zhang D F, Liu X Y, He G H, Shi Y S. Identification of CIPK gene family members and investigation of the drought tolerance of ZmCIPK3 in maize. *Journal Of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4):1064-1075
- [26] 杜强, 韩玲玲, 高芙蓉, 周逸龙, 彭子华, 王志龙, 陈秋红. 水稻 DUF761 基因家族成员鉴定与表达谱分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(5):1487-1499
Du Q, Han L L, Gao F R, Zhou Y L, Peng Z H, Wang Z L, Chen Q H. Identification and expression profile analysis of DUF761 gene family members in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(5):1487-1499
- [27] Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62:2431-2452
- [28] Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamaya T, Yamaguchi S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(28):9972-9977
- [29] 王娜. 小麦异戊烯基转移酶基因家族的生物信息学分析和 *TaIPT8* 的抗旱功能鉴定. 荆州: 长江大学, 2022
Wang N. Bioinformatics analysis of the isopentenyl transferase gene family in wheat and functional identification of *TaIPT8* in drought tolerance. Jingzhou: Yangtze University, 2022
- [30] 田晓芹, 褚晶, 丁洪霞. 藜麦异戊烯基转移酶基因(*CqIPT*)家族的全基因组鉴定与分析. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2023, 36(2):149-156
Tian X Q, Zhu J, Ding H X. Quinoa isoprene transferase gene (*CqIPT*) family Genome-wide identification and analysis. *Journal of Yantai University*, 2023, 36(2):149-156
- [31] Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le D T, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi, Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmölling T, Tran L S. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, 2011, 23(6):2169-2183
- [32] Rivero, Rosa M, Kojima, Mikiko, Gepstein, Amira, Sakakibara, Hitoshi, Mittler, Ron, Gepstein, Shimon,

- Blumwald, Eduardo. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104:19631-19636
- [33] Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(7):747-758
- [34] 李志强, 聂石辉, 王仙, 向莉, 刘恩良, 方伏荣. 大麦 SRO 家族的全基因组鉴定及生物信息学分析. *植物生理学报*, 2022, 58(8):1496-1506
- Li Z Q, Nie S H, Wang X, Xiang L, Liu E L, Fang F R. Genome wide identification and bioinformatics of SOR family in barley. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(8):1496-1506
- [35] 李民吉. 桃 ATP/ADP PpIPT 基因鉴定与表达分析. 泰安: 山东农业大学, 2015
- Li M J. Identification and characterization of ATP/ADP PpIPT genes in peach, TaiAn: Shandong Agricultural University, 2015
- [36] Akamatsu A, Nagae M, Nishimura Y, Romero Montero D, Ninomiya S, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Kawaguchi M, Takeda N. Endogenous gibberellins affect root nodule symbiosis via transcriptional regulation of NODULE INCEPTION in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, 2021, 105(6):1507-1520
- [37] 高秀华, 傅向东. 赤霉素信号转导及其调控植物生长发育的研究进展. *生物技术通报*, 2018, 34(7):1-13
- Gao X H, Fu X D. Research progress for the gibberellin signaling and action on plant growth and development. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(7):1-13
- [38] Wang Y, Shen W, Chan Z, Wu Y. Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis Thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 19(6):1004
- [39] 蔡兆明, 程春红, 廖静静, 王殿东. 茎瘤芥异戊烯基转移酶家族基因全基因组鉴定及表达分析. *西北植物学报*, 2022, 42(1):38-47
- Cai Z M, Chen C H, Liao J J, Wang D D. Genome-wide identification and expression analysis of Isopentenyl transferase family genes in tuber mustard. *Acta Botanica Brasilica-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(1):38-47