

研究报告 Original Papers

超量表达 *IPT* 和 *KN1* 基因对转基因烟草生长发育的影响

胥珊, 孙一铭, 贾之春, 罗克明*

西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆400715

摘要: 为了比较异戊烯转移酶基因 *IPT* 和玉米 *homeobox* 基因 *KN1* 超量表达对植物生长发育的影响, 将 *35S::IPT* 和 *35S::KN1* 分别导入烟草。观察发现, 过量表达 *IPT* 和 *KN1* 基因对植株再生频率、形态、生长周期和顶端优势等方面的影响均相似, 但在生根和开花结籽方面, *35S::IPT* 转基因植物所受影响更显著。细胞分裂素含量检测表明, *35S::IPT* 转基因植物叶片中细胞分裂素的含量高于 *35S::KN1* 转基因植物。

关键词: *IPT* 基因; *KN1* 基因; CaMV 35S; 转基因烟草

Effects of Overexpression of *IPT* and *KN1* on Development and Growth in Transgenic Tobacco Plants

XU Shan, SUN Yi-Ming, JIA Zhi-Chun, LUO Ke-Ming*

Key Laboratory of Eco-Environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To compare the effects of overexpression of isopentenyl transferase gene (*IPT*) and *Knotted1* gene (*KN1*) on plant development and growth, *IPT* and *KN1* under the control of the 35S promoter were introduced into *Nicotiana tabacum* cv. xanthi, respectively. Many of these phenotypes, which were characteristics of *35S::IPT* transgenic plants, were observed in plants overexpressing *KN1* gene, including increase in transformation rate, alteration of leaf morphology and loss of apical dominance. However, more flowers, shoots, roots and higher seed germination rate were observed in *35S::KN1* transgenic plants, compared to *35S::IPT* transgenic plants. Higher cytokinin content was observed in *35S::IPT* leaves than that in *35S::KN1* leaves.

Key words: *IPT* gene; *KN1* gene; CaMV 35S; transgenic tobacco

细胞分裂素是一种十分重要的植物激素, 它不仅能促进植物细胞的分裂和分化, 还具有诱导芽的生成和抑制细胞衰老等功能。前人的研究已证明 (Gan 和 Amasino 1995; McCabe 等 2001; Luo 等 2006a), 植物叶片衰老的延迟对于作物产量的提高和蔬菜采后的保鲜均具有重大经济价值。

目前, 在植物抗衰老基因工程中, 主要利用与细胞分裂素合成相关的基因包括异戊烯转移酶基因 (isopentenyl transferase gene, *IPT*) 和玉米 *homeobox* 基因 *Knotted1* (*KN1*) 等。*IPT* 基因由 Akiyoshi 等 (1984) 首先从根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中分离得到, 并证明其产物是细胞分裂素合成途径中的一个关键限速酶。已分离的 *IPT* 基因几乎都来源于微生物, 这些基因具有相当高的同源性。利用从根癌农杆菌中分离的 *IPT* 基因, 人们在植物叶片抗衰老基因工程方面已经做了大量的工作。结果显示, 组成型过量表达 *IPT* 基因的转基因植物中细胞分裂素的含量确实明显增加, 叶片的

衰老被延迟, 但转基因植物的生长发育以及形态均受到了明显的影响, 表现出花粉不育、叶片变小、侧枝增加、顶端优势丧失和根生长受抑制等表型 (Smart 等 1991; Li 等 1992; McKenzie 等 1998)。而对于 *KN1* 基因, 目前已在玉米、水稻、烟草等植物中克隆得到, 并证实了该基因在高等植物茎顶端分生组织的分化和维持中发挥重要作用 (Smith 等 1992; Lincoln 等 1994; Hareven 等 1996; Long 等 1996)。过量表达 *KN1* 也会导致转基因植物中细胞分裂素含量的增加, 并表现出与 *35S::IPT* 转基因植株相似的形态变化 (Sinha 等 1993; Lincoln 等 1994; Chuck 等 1996)。例如, *35S::KN1* 转基因植物叶片的衰老也被延迟 (Ori 等 1999; Luo 等 2006a)。但迄

收稿 2008-12-05 修定 2009-04-23

资助 国家自然科学基金项目(30871576)、人事部留学回国人员科技活动择优资助项目和重庆市自然科学基金重点项目(CSTC, 2009BA1004)。

* 通讯作者(E-mail: luokeming@hotmail.com; Tel: 023-68254530)。

今为止, 还未见到将 *IPT* 和 *KNI* 基因分别转入植物中, 就两基因过量表达对转基因植物生长发育的影响进行比较的研究。

本研究选取组成型启动子 CaMV 35S 和分别来自根癌农杆菌的 *IPT* 基因和来自玉米的 *KNI* 基因构建了 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 表达载体。将表达载体导入烟草后, 对 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株的再生频率、根的生长、植株形态、顶端优势和开花结籽等方面进行了详细的比较, 并检测了转基因幼苗中细胞分裂素的含量, 希望为将来植物抗衰老基因工程中细胞分裂素合成相关基因的选择提

供一定的实验依据。

材料与方法

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LAB4404 和遗传转化中所用植物材料烟草 (*Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi) 均为本实验室保存。植物表达载体以 pBI121 为基础, 分别构建由组成型表达载体 *35S::IPT* 和 *35S::KNI*, 具体构建过程见 Luo 等 (2006b)。载体的结构图谱见图 1。

烟草遗传转化采用改进后的叶盘法, 具体操作

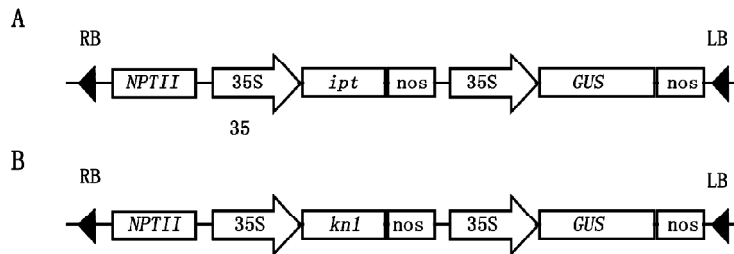


图1 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 表达载体示意图

Fig.1 A schematic illustration of plant binary vectors *35S::IPT* and *35S::KNI*

a: *35S::IPT* 表达载体示意图; b: *35S::KNI* 表达载体示意图。35S: 来源于花椰菜花叶病毒的组成性启动子; nos: 冠瘿碱合成酶基因终止子; *NPTII*: 新霉素磷酸转移酶基因; *GUS*: 葡萄糖苷酶基因; *IPT*: 异戊烯转移酶基因; *KNI*: 玉米 homeobox 基因 *knotted1*。

见 Luo 等 (2006b) 所述。转化后的叶片首先在 MSR 培养基 (MS 培养基 + 100 mg·L⁻¹ 利福平 (rifamycin) + 8 g·L⁻¹ 琼脂) 上预培养 3 d, 再分别转入 MS 和 MS/NB 培养基上进行筛选培养。2 种培养基都含有 8.0 g·L⁻¹ 琼脂、100 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (kanamycin), 其中 MS 培养基未添加任何植物激素, 培养基 MS/NB 为: MS 培养基 + 0.1 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA。将获得的再生小苗转入生根培养基 (MS 培养基 + 100 mg·L⁻¹ 利福平 + 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素 + 8 g·L⁻¹ 琼脂), 待根系生长发达后移栽至土壤中, 在温室中 25 °C 条件下继续培养。

GUS 组织染色时, 将再生植株叶片浸入含有 0.5 mL *GUS* 染色液的离心管中, 于 37 °C 下保温过夜, 用 100% (V/V) 乙醇脱色处理。*GUS* 染液配方为: 1.0 mg·L⁻¹ 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-葡萄糖苷、2% (V/V) 甲醇、1.0 mg·L⁻¹ K₄Fe(CN)₆、0.1% (V/V) Triton X-100 和 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)。

烟草基因组 DNA 提取采用 CTAB 法, 具体过程参见 Doyle 和 Doyle (1987) 的方法。转基因植株

的 PCR 检测以 *GUS* 阳性植株的基因组 DNA 为模板通过扩增标记基因 *NPTII* 进行筛选。根据抗性筛选标记基因 *NPTII* 的序列设计一对特异引物, 引物序列为 5' AGAGGCTATTCGGCTATGAC 3', 5' CCATGATATTCGGCAAGCAG 3'。在每个 25 μL 的 PCR 反应体系中含有, 50 ng 植物基因组总 DNA、50 mmol·L⁻¹ KCl、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 9.0)、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs、2.5 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 1 min、54 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 1 min、72 °C 延伸 10 min, 共 35 个循环。

烟草转化效率的统计参照 Luo 等 (2006b) 所述方法, 统计来源于 20 个被侵染叶片上获得的转化小苗数量, 其中以转化 pBI121 载体后在 MS/NB 培养基上获得的转基因阳性小苗数作为对照, 设定为 100%, *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 的阳性小苗的数量分别与 pBI121 阳性小苗数量的比值即为 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 的转化效率。

细胞分裂素含量测定参照南京农业大学提供

的 iPA、ZRs 酶联免疫吸附测定试剂盒说明书。

实验结果

1 转基因幼苗的获得

植物表达载体 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 通过根癌农杆菌 LBA4404 介导转化烟草, 同时以转化载体 pBI121 作为对照, 通过卡那霉素筛选后获得大量卡那抗性小苗。为了证实外源基因是否已整合到转基因小苗的基因组上, 对移入温室中生长 3 周的小苗进行了 GUS 组织染色, 结果显示, 超过 80% 的

卡那抗性小苗为 GUS 阳性(结果未显示)。选取部分 GUS 阳性植株进一步进行 PCR 检测, 扩增对象为 *NPTII* 基因, 琼脂糖电泳结果见图 2。根据图 2 的结果可知, 随机选取的 6 株 *35S::IPT* 转基因植株中, 仅有 1 株未检测到 PCR 阳性信号, 其余 5 株均检测到了与预期大小一致的 548 bp 的扩增条带。而在 *35S::KNI* 转基因植株中, 随机挑选 5 株进行 PCR 检测, 结果都呈阳性。说明在转基因幼苗中, 经过卡那霉素抗性筛选后, GUS 阳性植株中的绝大多数均为转基因小苗。

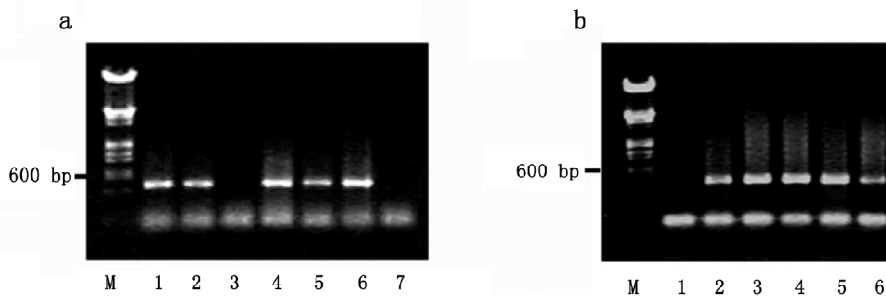


图2 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig.2 Identification of transgenic *35S::IPT* and *35S::KNI* plants

a. M: DNA 分子量标准; 1~6: *35S::IPT* 转基因植株 2、3、5、9、10 和 12; 7: 野生型植株。b. M: DNA 分子量标准; 1: 野生型植株; 2~6: 转基因 *35S::KNI* 植株 1、2、4、6 和 7。

2 过量表达 *IPT* 和 *KNI* 对烟草转化效率的影响

将植物表达载体 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转化烟草, 在培养基 MS 和 MS/NB 上进行筛选培养 60 d 后, 分别获得转基因小苗。为了分析过量表达 *IPT* 和 *KNI* 基因对烟草转化效率的影响, 分别对转基因小苗的数量进行统计。

如表 1 所示, 在含有 NAA 和 BA 的培养基 MS/NB 中, 各个表达载体转化烟草后均获得了大量转基因

阳性小苗, 其中转化 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 载体获得的转基因小苗数目明显多于转化对照载体 pBI121 所获得的转基因小苗数目。在培养基 MS 中, 尽管未添加任何植物激素, 但由于侵染后的烟草叶片中 *IPT* 基因和 *KNI* 基因过量表达, 转基因植株合成了大量内源性细胞分裂素, 从而产生了大量的转基因阳性小苗。比较 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株在 MS 培养基上的转化频率(243% 和

表 1 不同表达载体转化烟草后转化效率

Table 1 Regeneration rate of transgenic tobacco plants containing the different vectors

| 载体 | 培养基 | 被侵染叶盘数 | 卡那霉素抗性小苗 / 株 | 阳性小苗 ^a / 株 | 转化效率 ^b / % |
|-----------------|-------|--------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>35S::IPT</i> | MS | 20 | 85 | 70 | 200 |
| | MS/NB | 20 | 121 | 85 | 243 |
| <i>35S::KNI</i> | MS | 20 | 76 | 72 | 206 |
| | MS/NB | 20 | 105 | 86 | 246 |
| pBI121 | MS | 20 | 3 | 0 | 0 |
| | MS/NB | 20 | 37 | 35 | 100 |

a: GUS 染色和 PCR 检测均呈阳性的再生小苗。b: 转化效率(以转化 pBI121 载体的转基因阳性小苗数量为基准)的计算见“材料与与方法”部分。

246%)发现,两者无明显区别,该数据与我们前面工作中获得的结果相类似(Luo等2006b)。

3 转基因幼苗的生根频率分析

前人的研究结果已证实,过量的细胞分裂素将抑制根的生长(Li等1992; McKenzie等1998)。为了分析过量表达*IPT*和*KNI*基因对转基因烟草生根频率的影响,将表1中抗性筛选获得的转基因阳性小苗转入生根培养基(MS培养基+50 mg·L⁻¹卡那霉

素)中,3周后对各个培养皿中转基因小苗的生根情况进行统计。结果如表2所示, pBI121的转基因植株均能在生根培养基上正常生根(生根频率为100%),但35S::*KNI*和35S::*IPT*转基因植株的生根均受到了不同程度的抑制。35S::*KNI*转基因植株生根频率为53.3%,高于35S::*IPT*转基因植株36.7%的生根频率。

表2 转化不同载体的转基因小苗生根频率

Table 2 Rooting frequency of transgenic plants harboring different vectors

| 载体 | 培养基 | 阳性小苗数 ^a /株 | 生根的转基因小苗数/株 | 生根频率 ^b /% |
|------------------|-----|-----------------------|-------------|----------------------|
| 35S:: <i>IPT</i> | MS | 30 | 11 | 36.7 |
| 35S:: <i>KNI</i> | MS | 30 | 16 | 53.3 |
| pBI121 | MS | 30 | 30 | 100.0 |

a: GUS染色和PCR检测均呈阳性的转基因小苗。b: 生根频率(%)=(生根的转基因小苗/阳性小苗)×100%。

4 转基因幼苗形态变化的比较

将植物表达载体 pBI121、35S::*IPT* 和 35S::*KNI* 分别转化烟草,在 MS+NB 培养基上培养 8 周后,获得转基因小苗。如图 3 所示,与 pBI121 转基因烟草(图 3-a)相比,35S::*IPT* 和 35S::*KNI* 转基因植株出现较多的腋芽分枝、茎段增粗、顶端优

势不显著甚至丧失(图 3-b、c)。将转基因植株转入温室继续培养,45 d 后对其形态进行进一步观察。结果发现,与 pBI121 转基因烟草(图 3-a、d)相比,35S::*IPT* (图 3-b、e)和 35S::*KNI* (图 3-c、f)转基因小苗个体矮小,叶片偏小、有皱褶,叶色呈深绿色。比较而言,*IPT* 基因过量表达对转基因幼

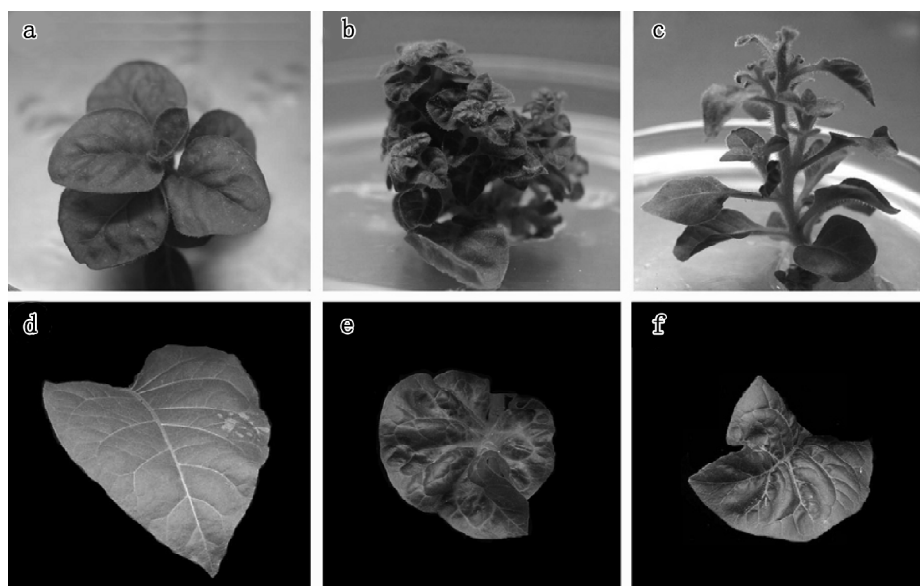


图3 转基因幼苗形态比较

Fig.3 Morphologic comparison of transgenic plants

a: pBI121 转基因植株作为对照; b: 35S::*IPT* 转基因植株; c: 35S::*KNI* 转基因植株; d: pBI121 转基因植株叶片作为对照; e: 35S::*IPT* 转基因植株叶片; f: 35S::*KNI* 转基因植株叶片。

苗形态的影响大于 *KNI* 基因过量表达对转基因幼苗形态的影响。

5 过量表达 *IPT* 和 *KNI* 对烟草开花及结籽的影响

为了研究过量表达 *IPT* 和 *KNI* 对烟草育性的影响, 分析了转基因植株开花和结籽的情况。结果发现, *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株的花期普遍延迟, 花蕾数量少于转基因 *pBI121* 烟草, 花瓣的发育严重畸形, 不能正常开花, 即使部分花蕾能够开花, 花粉发育仍不正常、大多败育(结果未显示)。

雌蕊发育异常, 柱头矮小甚至萎缩。相比较而言, *KNI* 过量表达对花发育的影响明显小于 *IPT* 基因过量表达对花发育的影响, *35S::KNI* 转基因植株中大部分花粉可育。

为检测转基因植物的种子是否可育, 分别收集 *35S::IPT* 转基因植株 2、5、9 号和 *35S::KNI* 植株 1、2、4 号的种子, 种子萌发后统计 F_1 代的小苗数。结果发现这些转基因植株的种子萌发率很低, 多数不育, 尤其是 *35S::IPT* 转基因植株的种子(表 3)。

表 3 转基因植物 F_0 代种子萌发效率

Table 3 Germination rate of transgenic plants

| 转基因植株 | 编号 | 所有种子数 / 粒 | 可育种子数 / 粒 | 不育种子数 / 粒 | 萌发效率 ^a / % |
|-----------------|----|-----------|-----------|-----------|-----------------------|
| <i>35S::IPT</i> | 2 | 283 | 49 | 234 | 17.3 |
| | 5 | 18 | 0 | 18 | 0 |
| | 9 | 462 | 155 | 307 | 33.5 |
| <i>35S::KNI</i> | 1 | 596 | 277 | 319 | 46.5 |
| | 2 | 357 | 139 | 218 | 38.9 |
| | 4 | 286 | 108 | 178 | 37.8 |

a: 萌发效率(%)= 可育种子 / 所有种子 × 100%。

6 转基因幼苗中细胞分裂素含量的比较

在 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株中, 由于细胞分裂素的大量合成, 导致植物体内激素比例发生了改变, 从而严重影响转基因植物的生长发育。比较转基因植株的形态变化可看出(图3), *35S::IPT* 转基因小苗的形态所受的影响大于 *35S::KNI* 转基因植株, 推测在 *35S::IPT* 转基因植株中细胞分裂素的含量可能更高。为了分析转基因幼苗中细胞分裂素含量的差异, 分别选取 PCR 鉴定为阳性的 *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因烟草, 采用间接酶联免疫法测定其叶片中细胞分裂素的含量(吴颂如等 1988)。结果表明, *35S::IPT* 和 *35S::KNI* 转基因植株叶片中的细胞分裂素含量明显高于 *pBI121* 转基因植株(图4), 而在 *IPT* 基因过量表达的转基因植株叶片中, 细胞分裂素的含量略高于 *35S::KNI* 转基因植株。

讨 论

植物生长是以光合作用为基础的, 适当延迟叶片的衰老, 延长植物营养生长期, 增加光合产物的合成量, 将有助于提高作物的产量。同时, 在蔬菜生产中, 延缓叶片的衰老不仅能够提高其产量, 而

且有利于蔬菜收获后的储藏和保鲜。

很早以前就已经发现, 采用细胞分裂素处理很多植物都可以延迟植物叶片衰老。Nooden 等 (1990) 在衰老的植物木质部中发现了细胞分裂素的含量下降, 因此认为这是植物衰老的起始信号。于是人们将编码细胞分裂素合成途径中起关键作用的异戊烯基转移酶基因 *IPT* 导入植物中, 希望内源细胞分裂素水平的增加能够延缓植物衰老。已有的报道表明, *IPT* 基因转化植物确实可以提高细胞中细胞分裂素的含量, 但过量的细胞分裂素也给转

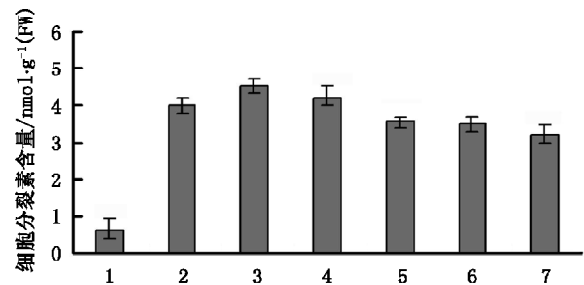


图 4 转基因植株叶片中的细胞分裂素含量

Fig.4 Cytokinin content in leaves of transgenic plants

1: *pBI121* 转基因植株作为对照; 2~4: *35S::IPT* 转基因植株; 5~7: *35S::KNI* 转基因植株。

基因幼苗的生长发育带来了明显不利的影响(Smart等1992; Li等1992)。前人的研究还发现,来自于玉米的homeobox基因家族的基因*KNI*在转基因植物中过量表达,也会对其生长发育带来类似*IPT*基因过量表达的影响(Sinha等1993; Lincoln等1994; Chuck等1996)。

为了避免过量细胞分裂素产生所带来的植株生长发育不正常的问题, Gan和Amasino(1995)将*IPT*基因与植物衰老特异性表达基因*SAG12*的启动子融合在一起,构建了一个可调控*IPT*基因表达水平的系统,在转基因烟草中得到了发育正常但衰老延迟的植株,目前该系统已导入许多植物(如水稻、莴苣、青菜等)中并获得了成功(付永彩等1999; McCabe等2001; 袁政等2002)。Ori等(1999)将*SAG12*启动子与*KNI*基因融合,也推迟了转基因植物的衰老并且未产生明显不利生长的影响。因此通过特异性表达*IPT*基因和*KNI*基因,在转基因植物衰老过程中增加叶片细胞分裂素的含量,能够延迟叶片的衰老,这对于提高作物的产量和改良蔬菜的品质具有很大的经济价值。

我们的实验比较了过量表达*IPT*基因和*KNI*基因给转基因烟草带来的影响。结果表明,转基因烟草中,过量表达*IPT*基因和*KNI*基因都大大提高了转基因小苗的转化频率(表1),同时,转基因幼苗出现叶片变小皱缩、腋芽分枝明显增加、顶端优势丧失等与预期一致的表型(图3)。但比较两种转基因植物的形态可以看出,35S::*IPT*转基因烟草比35S::*KNI*转基因烟草所发生的变化更大些。检测转基因植物叶片中细胞分裂素的含量发现,转基因35S::*IPT*烟草中的细胞分裂素相对含量更高(图4),这可能也是转基因35S::*IPT*植株形态变化更大的原因。我们对35S::*IPT*和35S::*KNI*转基因植株的生根情况进行了分析,结果显示,35S::*KNI*转基因烟草有更高的生根频率。在转基因植株开花和结籽方面,前人的结果已表明,采用种子特异性启动子Lectin调控*IPT*基因的表达,可以促进种子膨大,提高幼苗萌发(王兴美2005)。在本研究中,过量表达*IPT*和*KNI*均导致烟草花不同程度的败育和种子的萌发率降低,相比较而言,35S::*IPT*转基因烟草的花和可育种子的数量明显少于35S::*KNI*转基因烟草,推测这些差异也可能是由于不同转基因植物中细胞分裂素水平的不一致所造成的。该结果说

明,采用组成型强启动子调控细胞分裂素基因在植物中表达,对转基因植物的生长发育存在明显不利的影响。

在同一种植物中都采用强启动子CaMV 35S控制*IPT*基因和*KNI*基因的表达,为什么对转基因植物后代的影响却不完全相同?前人的研究表明,*IPT*基因是细胞分裂素生物合成的关键酶和限速酶基因,它直接参与细胞分裂素的合成,而*KNI*基因对于细胞分裂素合成的影响是间接的,它可能是作为上游调节基因通过控制下游细胞分裂素生物合成关键酶基因(包括*IPT*基因)来实现对细胞分裂素的调控(Kamimoto 1996; Brandstatter和Kieber 1998; Ori等1999),但是目前还没有实验结果证实该推论,有待进一步研究。

参考文献

- 付永彩,刘新仿,曹守云,孙传清,李自超,唐祚舜,王象坤,李良才,田文忠(1999). 水稻中抑制衰老的嵌合基因的基因枪转化和表达分析. 农业生物技术学报, 7 (1): 17~22
- 王兴美(2005). 种子特异启动子调控*ipt*基因表达对烟草种子发育的影响[硕士论文]. 北京: 中国科学院研究生院(植物研究所)
- 吴颂如,陈婉芬,周燮(1988). 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素. 植物生理学通讯, (5): 53~57
- 袁政,潘爱虎,简志英,徐淑平, Gan SS, 黄海, 张大兵 (2002). 转基因(*SAG12-IPT*)青菜的迟衰特性. 植物生理与分子生物学报, 28 (5): 379~384
- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (19): 5994~5998
- Brandstatter I, Kieber JJ (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10: 1009~1019
- Chuck G, Lincoln C, Hake S (1996). *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. Plant Cell, 8: 1277~1289
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 9: 11~15
- Gan S, Amasino RM (1995). Inhibition of leaf senescence autoregulated production of cytokinin. Science, 270: 1986~1988
- Hareven D, Gutfinger T, Parnis A, Eshed Y, Lifschitz E (1996). The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. Cell, 84: 735~744
- Kakimoto T (1996). CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. Science, 274: 982~985
- Li Y, Hagen G, Guilfoyle TJ (1992). Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. Dev Biol, 153: 386~395

- Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S (1994). A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, 6: 1859~1876
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, 379: 66~69
- Luo K, Deng W, Xiao Y, Zheng X, Li Y, Pei Y (2006a). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize *knotted1* gene under the control of a wound-inducible promoter. *Plant Cell Rep*, 25 (11): 1246~1254
- Luo K, Zheng X, Chen Y, Xiao YH, Zhao D, McAvoy R, Pei Y, Li Y (2006b). The maize *Knotted1* gene is an effective positive selectable marker gene for *Agrobacterium*-mediated transformation in tobacco. *Plant Cell Rep*, 25 (5): 403~409
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJRM, Stoopen GM, Davelaar E, van Rhijn JHA, Power JB, Davey MR (2001). Effects of P_{SAG12}-*IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol*, 127: 505~516
- McKenzie MJ, Mett V, Reynolds PHS, Jameson PE (1998). Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. *Plant Physiol*, 116: 969~977
- Nooden LD, Singh S, Letham DS (1990). Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiol*, 93: 33~39
- Ori N, Juarez MT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM, Hake S (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*, 11: 1073~1080
- Sinha NR, Williams RE, Hake S (1993). Overexpression of the maize homeobox gene *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev*, 7: 787~795
- Smart CM, Scofield SR, Bevan MW, Dyer TA (1991). Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell*, 3: 647~656
- Smith LG, Greene B, Veit B, Hake S (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development*, 116: 21~30