

王华, 潘祺, 鞠萌, 等. 黄冠梨 *PbpNCED3* 基因的克隆与表达 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 82-88.
WANG Hua, PAN Qi, JU Meng, et al. Cloning and expression of *PbpNCED3* gene from 'Huangguan' pear[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(3): 82-88.

黄冠梨 *PbpNCED3* 基因的克隆与表达

王 华, 潘 祺, 鞠 萌, 汪紫莼, 汪王微, 王瑞生, 朱立武
(安徽农业大学 园艺学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】克隆黄冠梨 *Pyrus bretschneideri* ‘Xuehuali’ × *P. pyrifolia* ‘Shinsseiki’ 叶片中的 9-顺式-环氧类胡萝卜素裂解双加氧酶 (*NCED*) 基因的全长 cDNA 序列, 研究不同程度干旱条件下该基因的表达及与叶片内源脱落酸 (ABA) 的动态变化关系, 为明晰该基因在梨树抗旱中的分子机理提供理论依据。【方法】根据转录组数据得到的 *PbpNCED3* 序列进行同源序列扩增, 通过生物信息学分析确定其属于 *NCED* 家族基因。通过酶联免疫吸附法测定不同水分条件下梨叶片内源 ABA 的含量, 通过实时荧光定量测定 *PbpNCED3* 基因的表达量。【结果】*PbpNCED3* cDNA 序列全长为 1 831bp, 编码 603 个氨基酸 (GeneBank 登录号为: MH749461)。该蛋白具有 *NCED* 发挥功能所依赖的 4 个保守的组氨酸, 有 *NCED* 家族特有保守结构域序列 MIAHPKxDP 和 HDFAITE 及 RPE65 结构域, N-端含有靶向叶绿体的转运肽。蛋白结构预测发现, 该蛋白与玉米 vp14(*NCED* 家族蛋白) 比对序列相似性为 70%, 且具有两亲性的 α 螺旋结构。*PbpNCED3* 基因的表达量与梨叶片 ABA 的含量成正相关关系 (相关系数为 0.914), 且二者都受到干旱的诱导。【结论】试验所得到的黄冠梨 *PbpNCED3* 属于 *NCED* 家族基因, 该基因响应干旱胁迫, 其表达量与内源 ABA 的含量动态变化趋势一致。

关键词: 黄冠梨; *NCED* 基因; 基因克隆; 脱落酸; 基因表达; 干旱
中图分类号: S661.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)03-0082-07

Cloning and expression of *PbpNCED3* gene from ‘Huangguan’ pear

WANG Hua, PAN Qi, JU Meng, WANG Ziyu, WANG Wangwei, WANG Ruisheng, ZHU Liwu
(School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Objective】To clone the full-length cDNA sequence of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) gene from leaves of *Pyrus bretschneideri* ‘Xuehuali’ × *P. pyrifolia* ‘Shinsseiki’ cultivar ‘Huangguan’, study the relationship between its expression and the endogenous abscisic acid (ABA) content in leaves under different degree of drought, and provide a theoretical basis for understanding the molecular mechanism of the gene in drought resistance of pear tree. 【Method】According to the *PbpNCED3* sequence obtained from the transcriptome data, the full-length cDNA sequence was cloned by homologous sequence amplification. The sequence was identified as belonging to the *NCED* family by bioinformatics analysis. Endogenous ABA content in pear leaves under different soil moisture conditions was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA), and the expression of *PbpNCED3* gene was measured by real time qPCR. 【Result】The *PbpNCED3* cDNA sequence is 1 831 bp encoding 603 amino acids. The protein has four conserved histidines required for activity, two conservative domain (MIAHPKxDP and HDFAITE) characteristic of the *NCED* family and a RPE65 domain. There is a putative chloroplast-targeting peptide at N-terminal. The protein structure prediction

shows that the protein sequence has 70% similarity to vp14 (NCED family protein) and it has a amphipathic α helix structure. *PbpNCED3* gene expression is positively related with ABA content in pear leaves with a correlation coefficient of 0.914, and both of them are induced by drought. 【Conclusion】 The *PbpNCED3* gene obtained from the experiment belongs to the *NCED* family. It responses to drought stress and its expression shares a similar dynamic trend with ABA content in pear leaves.

Key words: ‘Huangguan’ pear; *NCED* gene; gene cloning; abscisic acid; gene expression; drought

作为高等植物最重要的激素之一，脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 不但在植物的开花^[1]、果实成熟^[2]、种子休眠等^[3] 等生长发育过程中发挥重要的作用，而且在植物响应逆境中扮演着不可替代的角色。前人研究发现，生物胁迫和非生物胁迫都可以引起植物体内 ABA 含量的变化^[4-6]，而外源 ABA 可以不同程度地提高植物的抗逆性^[7-8]。

植物中 ABA 对多种胁迫响应的分子机制是复杂的，但人们开展对植物响应逆境时 ABA 含量变化的研究发现，ABA 生物合成中的主要限速酶 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED) 在期间起着关键的作用，且 *NCED* 基因表达量与 ABA 的含量变化有直接关系^[9]。

植物中的 *NCED* 多以家族基因形式存在，自从该家族首个成员自玉米 *Zea mays* 的 ABA 缺失突变体 *vp14* 中克隆得到后^[10]，人们从拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[11]、叶子花 *Bougainvillea glabra*^[12]、茶树 *Camellia sinensis*^[13] 等植物中也陆续克隆到了 *NCED* 基因，且研究发现，在烟草 *Nicotiana plumbaginifolia* 中转入菜豆 *Phaseolus vulgaris* 的 *PvNCED1* 基因，提高了植物体内 ABA 的积累及对干旱的耐受性^[14]，在拟南芥中转入油菜 *Brassica napus* 的 *BnNCED3* 基因也可以提高植株的抗逆性^[15]。这些研究表明 *NCED* 基因对植物抗旱性具有正调控的功能，在作物抗旱分子育种中具有潜在的应用价值。

梨是我国的大宗水果之一，其产量和品质备受人们关注。随着全球干旱气候的加剧，水分短缺成为我国北方梨园生产的限制性因素之一^[16]。通过基因工程的方法提高梨树的抗旱性则是一条提高水分生产率的有效途径。本研究在前期转录组研究的基础上^[17]，以生产中发现的抗旱性较强的黄冠梨 *Pyrus bretschneideri* ‘Xuehuali’ × *P. pyrifolia* ‘Shinsseiki’ 叶片为试验材料，克隆其 *NCED* 基因，并分析该基因在不同水分条件下的表达模式及与梨叶片内源 ABA 合成的关系，以期为后续的梨树分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

2014 年 7 月上、中旬于安徽农业大学生物科技楼人工气候室采集 2 年生黄冠梨嫁接盆苗 (杜梨为砧木) 叶片为供试材料，用于 *PbpNCED3* 基因克隆；对黄冠梨树盆苗进行不同水分处理：正常浇水 (对照)，干旱处理和旱后复水处理，其中对照和旱后复水的土壤含水量 (w) 均为 70%±5%，干旱处理的土壤含水量 (w) 为 20%±5%；分别采集对照、干旱处理的第 1 天、第 4 天、第 7 天和复水第 3 天的梨叶片用于 ABA 含量及不同水分条件下基因表达量的测定。

上述叶片均采自梨树梢部从上往下第 4~6 片成熟功能叶，每个处理 3 株苗，每株梨树所采的叶片为 1 个重复，共 3 个生物学重复。叶片采下后置 于 50 mL 离心管，迅速用液氮处理后放置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 叶片内源 ABA 的测定 不同处理下梨叶片 ABA 的含量参考 Zhao 等^[18] 的方法，用酶联免疫吸附法测定。

1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 各供试材料用液氮研磨后取 100 mg，按照天根 (TIANGEN，天根生化科技有限公司，北京) 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型) 说明书方法提取梨叶片总 RNA。RNA 的浓度采用微量核酸浓度检测仪检测，RNA 的完整性通过 8.82 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。符合质量要求的总 RNA 放置在 -80 ℃ 冰箱备用。

以梨叶总 RNA 为模板，参照宝生物公司 (大连) 的反转录试剂盒 (FastQuant RT Kit) 说明书的方法获得 cDNA 第 1 链，用于后续的 RT-PCR 扩增和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 测定。

1.2.3 *PbpNCED3* 基因全长 cDNA 克隆 根据转录组数据得到的 *PbpNCED3* 基因序列，在 NCBI 网站 Blastx 比对结果显示具有完整开放阅读框。在该序列上下游的起始、终止密码子附近设计全长引物 *PbpNCED3*-F 和 *PbpNCED3*-R 进行同源序列扩增 (表 1)。RT-PCR 扩增体系为：模板 1.0 μL，abm

Kodacq 2×PCR master mix 聚合酶 12.5 μL, 正反向引物各 1.0 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 57 ℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环。PCR 扩增产物利用 10.59 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用生工 Sangon Biotech SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收纯化, 然后使用北京全式金 Transgen 生物公司生产的 Blunt-zero T 载体试剂盒进行连接, 质粒转入 TaKaRa 公司生产的 T1 大肠埃希菌感受态细胞并扩繁, 对多个阳性单克隆菌落进行 PCR 检测, 挑选 3 个阳性克隆菌液送至上海桑尼生物有限公司进行测序。

1.2.4 *PbpNCED3* 基因生物信息学分析 基因全长序列的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 查找和同源性分析在 NCBI 网站进行; 序列使用 DNAMAN6.0 软件进行多序列比对; 经过 ClustalX1.81

比对后的序列利用 MEGA5.2 软件采用邻近相连法构建系统发育进化树; 这条基因所编码的蛋白疏水性和理化性质通过 ExPASy 在线软件 (<https://web.expasy.org>) 预测, 而磷酸化位点、糖基化位点及亚细胞定位的预测则通过 ProP 在线程序 (<http://www.cbs.dtu.dk>) 完成, 二级结构和三级结构的模拟运用 SOPMA 和 SWISS-MOLDEL 软件完成。

1.2.5 *PbpNCED3* 基因表达分析 根据 *PbpNCED3* 基因全长, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计出荧光特异引物 qPbp NCED3-F 和 qPbpNCED3-R, 内参为 Actin173(引物见表 1)。采用 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green) 试剂盒, 按照说明书操作, 在 STEPONE 荧光定量 PCR 仪上检测 *PbpNCED3* 基因表达, 分析 *PbpNCED3* 基因在不同水分条件下的相对表达模式。试验结果利用 SPSS13.0 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[19] 进行计算。

表 1 引物名称和序列
Table 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	序 列 Sequences (5'→3')
PbpNCED3-F	CAACTC TTCCAAAAGCACCC
PbpNCED3-R	ACCGTTCTATCTATGCCTGATTAC
qPbpNCED3-F	AGGTTACATTCTGACGTTTCGTT
qPbpNCED3-R	CCGTTCTATCTATGCCTGATTT
Actin173-F	TTCGTTTTGCGTTTTAGTCCC
Actin173-R	GGAACAAAAGGAATAAAGAGGC

2 结果与分析

2.1 黄冠梨 *PbpNCED3* 基因克隆与序列分析

以黄冠梨叶片为材料提取总 RNA, 反转录得第 1 链, 并以此为模板, 利用特异性引物 PbpNCED3-F 和 PbpNCED3-R 进行同源序列扩增, 获得了长度为 1 831 bp 的 cDNA 序列 (图 1)。经过在 NCBI 网站的 Protein Blast 的分析发现, 该基因的蛋白与多种植物的 NCED 蛋白同源, 其中与砂梨 *P. pyrifolia* NCED3 蛋白 (GeneBank: AJO53638.1) 和中国白梨 *P. bretschneideri* NCED5 蛋白 (GeneBank: XP_009369000.1) 的序列相似性都达到了 99%。

利用 NCBI 网站的 ORF finder 对获得的 cDNA 进行分析发现, 该片段包含 1 812 bp 的 ORF, 16 bp 的 5'非翻译区和 3 bp 的 3'非翻译区, 其编码的蛋白质含有 603 个氨基酸 (GeneBank 登录号为: MH749461)。

2.2 *PbpNCED3* 蛋白结构域分析

将 *PbpNCED3* 蛋白通过在 NCBI 网站进行

Protein BLAST, 发现其与砂梨等 11 种植物的 NCEDs 蛋白序列相似性都达到 85% 以上 (图 2), 将这些蛋白序列运用 DNAMAN6.0 进行多序列比对发现, 1~87 的氨基酸并不保守, 但此后的序列保守性很强, 且 *PbpNCED3* 具有 NCED 家族特有的 2 个保守结构域序列 MIAHPKxDP 和 HDFAITE 以

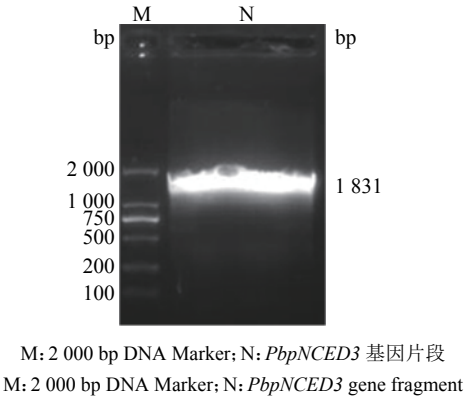


图 1 *PbpNCED3* 基因 PCR 扩增结果
Fig. 1 The result of *PbpNCED3* PCR amplification

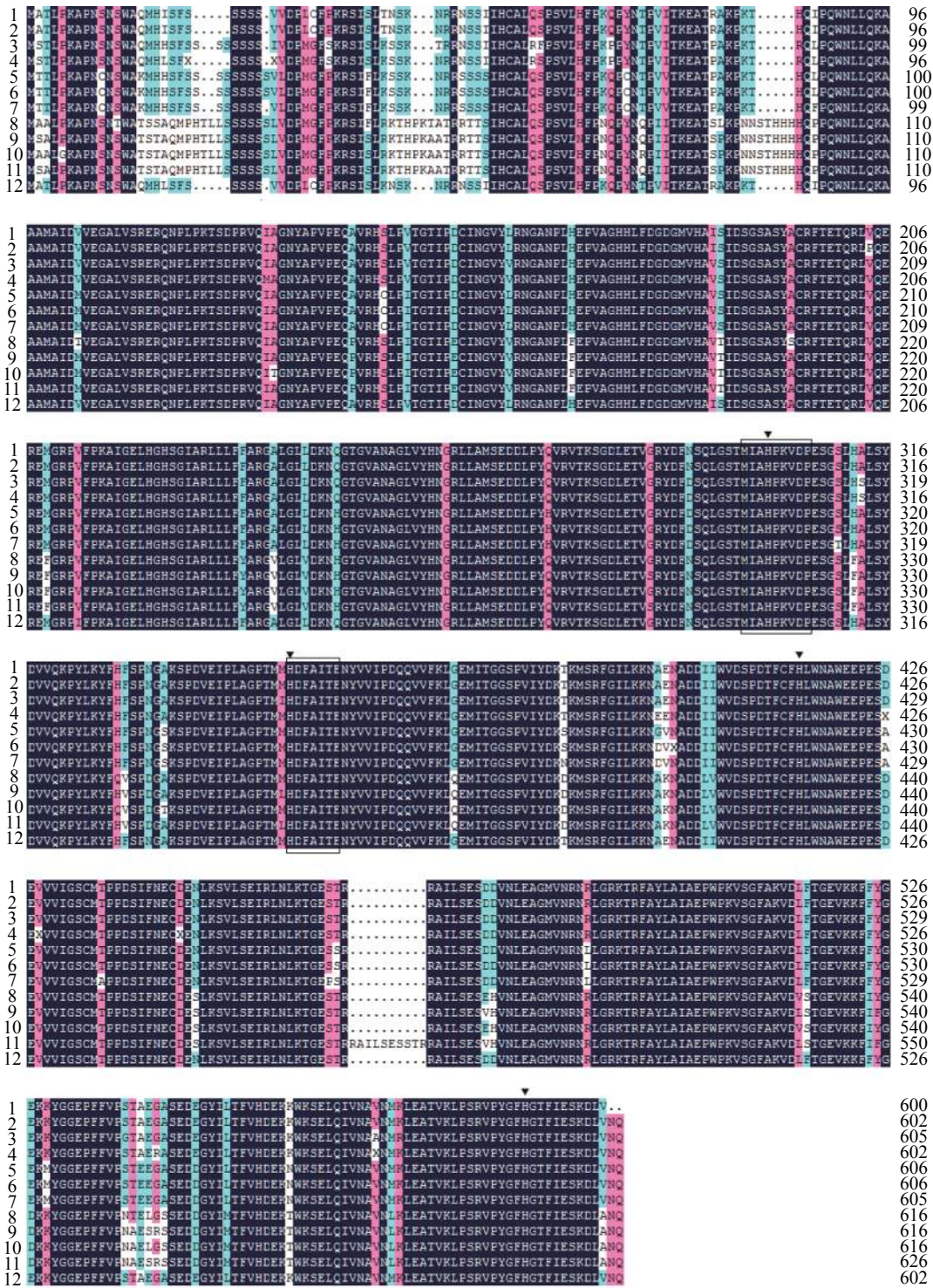


图 2 PbpNCED3 氨基酸序列与其他植物 NCEDs 的多重序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of PbpNCED3 and NCEDs in other plants

及 4 个保守的组氨酸残基。进一步使用 SMART 服务器分析 PbpNCED3 蛋白的结构功能域, 结果表明 PbpNCED3 蛋白第 131~595 氨基酸之间是一个

高度保守的结构功能域 RPE65, 这是参与类胡萝卜素生物合成的 NCED 酶的典型特征, 说明 *PbpNCED3* 属于 *NCEDs* 家族基因。

2.3 PbpNCED3 基因系统发育分析

利用 ClustalX(1.81) 和 MEGA5.2 软件, 通过与拟南芥中 NCEDs 家族的氨基酸序列比对发现,

PbpNCED3 和拟南芥中的几个 NCED 蛋白分聚在了同一聚类簇中(图 3), 并且与 AtNCED3 的序列相似度最高, 达到了 68.65%。

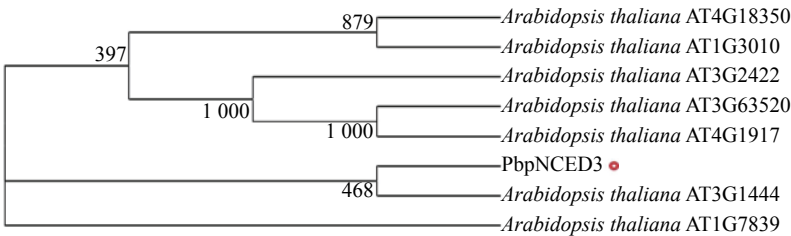
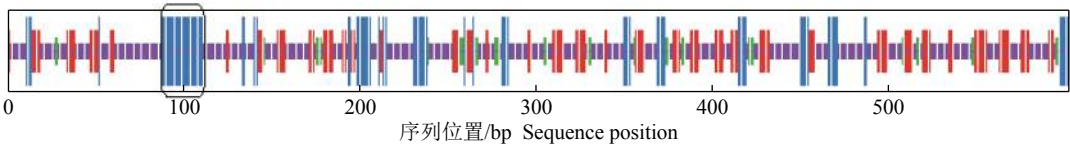


图 3 PbpNCED3 蛋白系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of PbpNCED3 protein

2.4 PbpNCED3 蛋白空间结构预测

利用 SOPMA 在线预测 PbpNCED3 蛋白质二级结构, 该结构 57.55% 为无规则卷曲, 24.21% 为延伸链, 13.60% 为 α 螺旋, 4.64% 则是 β 转角, 其中无规则卷曲和延伸链是该蛋白最大量的结构元件(图 4), 进一步通过 ProtScale 在线软件分析该蛋白疏水性发现, 位于序列上游的 95~111 的一段氨基酸序列 KAAAMAIDVVEGALVSR 是一段具有两

亲性的 α 螺旋区, 疏水值在-1.164~2.056 之间。使用 SWISS-MODEL 软件预测了 PbpNCED3 蛋白的三维立体结构(图 5), 且该软件以玉米 vp14 蛋白(PDB ID: 3npeA)(NCED 家族基因)为比对模板, 比率为 70%, GEQE 为 0.77(说明预测结果的准确性和可靠性高), 进一步证明该基因属于 NCEDs 基因家族。



α 螺旋和 β 转角分别用垂直的长蓝线和短绿线表示, 不规则卷曲和延伸链分别用短紫线和长红线表示, 100 aa 附近长蓝线为一段具有两亲性的 α 螺旋
Long blue line represents α helix and short green line represents β turn, short purple line represents random coil, long red line represents extended strand, long blue lines near 100 aa represent an amphiphilic α helix region

图 4 PbpNCED3 蛋白二级结构
Fig. 4 Secondary structure of PbpNCED3 protein

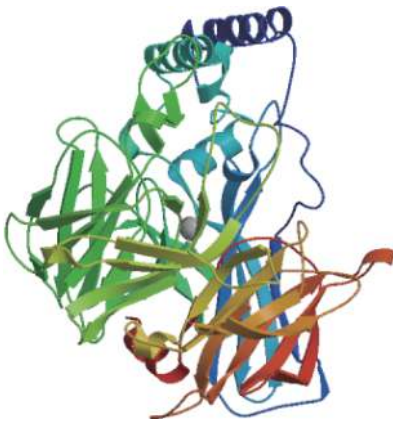


图 5 PbpNCED3 蛋白三维结构
Fig. 5 Three-dimensional structure of PbpNCED3 protein

2.5 PbpNCED3 蛋白基本性质分析

2.5.1 理化性质分析 使用 Expasy 的在线 ProtParam 软件分析预测出这条基因编码的蛋白分子式为 $C_{2\ 979}H_{4\ 649}N_{815}O_{883}S_{21}$, 相对分子质量为

66 700, 等电点 (pI) 为 6.56。该蛋白中数量最多的氨基酸分别是亮氨酸 (8.1%, 49 个) 和丝氨酸 (8.1%, 49 个), 其次是缬氨酸 (7.6%, 46 个), 丙氨酸 (7.5%, 45 个), 甘氨酸 (7.0%, 42 个) 和脯氨酸 (6.8%, 41 个)。脂肪族氨基酸指数 (Aliphatic index) 为 81.33, 总平均疏水指数 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为-0.309, 该蛋白为亲水蛋白。
2.5.2 亚细胞定位 通过 TargetP 软件进行亚细胞定位预测, 发现 PbpNCED3 含有的叶绿体转运肽 (Chloroplast transit peptide, cTP)、线粒体靶向肽 (Mitochondrial targeting peptide, mTP) 和分泌途径的信号肽 (Signal peptide, SP) 的决定性系数分别是 0.824、0.128 和 0.009(其界限值均设定为 0.00~1.00), 由此可见 PbpNCED3 在细胞中的亚细胞定位有可能是靶向叶绿体。

进一步通过 TMHMM-2.0 和 Signal P4.1 软件

分别对 *PbpNCED3* 蛋白的跨膜结构和信号肽序列进行预测, 结果显示, *PbpNCED3* 蛋白无跨膜结构, 亦无信号肽, 进一步证明该蛋白为非分泌型蛋白。

2.5.3 潜在磷酸化位点和糖基化分析 利用在线软件 Net Phos3.1 进行磷酸化位点预测, 结果表明有 65 个丝氨酸、24 个苏氨酸和 8 个酪氨酸可能是蛋白激酶磷酸化的位点 (图 6)。利用在线分析软件 DictyOGlyc 进行糖基化位点预测, 结果表明 *PbpNCED3* 不存在潜在的糖基化位点。

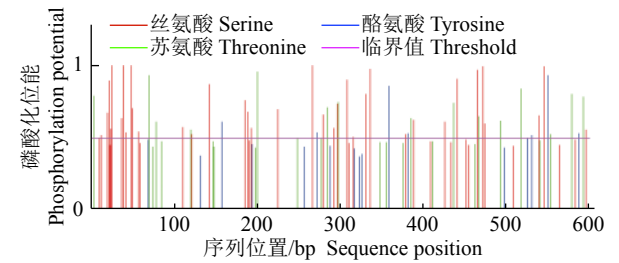
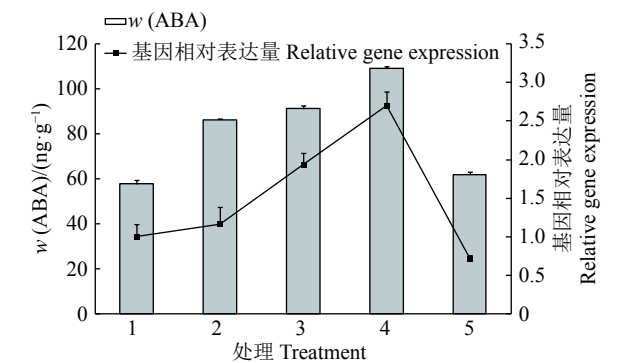


图 6 *PbpNCED3* 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 6 Prediction of phosphorylation site of *PbpNCED3* protein

2.6 *PbpNCED3* 基因表达分析

由图 7 中可见, 随着干旱胁迫的加重, *PbpNCED3* 基因的表达量与叶片内源 ABA 的含量都出现逐步增加的趋势, 复水后二者都急剧下降。进一步通过相关分析发现, 二者的动态趋势关系密切 ($R=0.914$), 表明该基因的表达与 ABA 的合成成正相关。



1: 对照, 2: 干旱 1 d, 3: 干旱 4 d, 4: 干旱 7 d, 5: 复水 3 d

1: Control, 2: One day of draught, 3: Four days of drought, 4: Seven days of drought, 5: Three days of re-watering

图 7 *PbpNCED3* 基因的 RT-qPCR 验证及黄冠梨叶片中 ABA 含量的动态变化

Fig. 7 RT-qPCR validation of *PbpNCED3* gene and the dynamic change of ABA content in leaves of 'Huangguan' pear

3 讨论与结论

在本研究的前期研究中, 我们发现黄冠梨中的 *PbpNCED3* 基因在干旱处理前后差异表达, 推测

该基因参与了黄冠梨的抗旱响应^[17]。在此基础上, 我们以黄冠梨的叶片为供试材料, 克隆得到了 *PbpNCED3* 基因的 cDNA 序列, 对其氨基酸序列进行分析发现: 该序列具有 NCED 发挥功能所依赖的 4 个保守的组氨酸, 多序列比对分析发现其有 NCED 家族特有保守结构域序列 MIAHPKxDP 和 HDFAITE, 且其具有 RPE65 结构域, 亚细胞定位分析发现其 N-端含有靶向叶绿体的转运肽, 蛋白结构预测发现其与玉米 vp14 比对相似性为 70%, 且含有两亲性的 α 螺旋结构。这些都是 NCEDs 家族基因典型的特征^[20-24], 说明试验所得到的 cDNA 序列确实属于 NCEDs 家族基因。

目前, 在拟南芥中已经克隆到了 7 个 *AtNCEDs* 基因 (<https://www.arabidopsis.org/>), 而在对干旱的研究中, *AtNCED3* 基因表现很突出^[25-26], 且在逆境中其表达量与 ABA 含量成正比。人们将 *AtNCED3* 基因转入水稻发现, 转基因植株的抗旱性明显提升^[27-28]。同时, 人们在对其他作物如油菜^[17], 甘草 *Glycyrrhiza*^[29]、水稻 *Oryza sativa*^[30] 中都克隆到了 *NCED3* 基因, 且进一步证明 ABA 含量的变化与 *NCED3* 基因有直接关系, 且水稻 *nced3* 突变体中 ABA 含量低于野生型植株, 在转基因植株中过表达 *OsNCED3* 基因可以提高植株的耐水胁迫能力, 且促进叶片衰老、提高 ABA 含量。本研究中的 *PbpNCED3* 基因在进化树比对中与 *AtNCED3* 聚在一支, 推测二者在基因功能上有相似之处, 且在不同土壤水分的处理中, *PbpNCED3* 基因的表达量与黄冠梨叶片内源 ABA 的含量成正向关系, 所以我们推断 *PbpNCED3* 基因可能是通过调控 ABA 的含量来应对黄冠梨的干旱胁迫。

总之, ABA 生物合成及其调控虽然是一个多因素参与的复杂过程, 但 NCED 作为其合成途径中的限速酶之一, 可以作为 ABA 生物合成分子调控研究的重要切入点。本研究从黄冠梨叶中克隆到了一个 *NCED* 同源基因, 并分析了该基因表达与内源 ABA 含量之间的内在联系, 推测其在调控植物抗旱过程中的作用, 这些结果为了解黄冠梨中 ABA 的生物合成机制以及进一步通过转基因工作培育抗旱梨树品种奠定了基础。

参考文献:

[1] TRIVELLINI A, FERRANTE A, VERNIERI P, et al. Effects of promoters and inhibitors of ethylene and ABA on flower senescence of *Hibiscus rosasinensis* L.[J]. *J Plant Growth Regul*, 2011, 30(2): 175-184.

[2] CHEN P, SUN Y F, KAI W B, et al. Interactions of ABA

- signaling core components (*SIPYLs*, *SIPP2Cs*, and *SIS-nRK2s*) in tomato (*Solanum lycopersicon*)[J]. *J Plant Physiol*, 2016, 205: 67-74.
- [3] 苏海兰, 周先治, 李希, 等. 云南重楼种子萌发过程内源激素含量及酶活性变化研究 [J]. 核农学报, 2018, 32(1): 141-149.
- [4] 邓文红, 沈应柏, 陈华君, 等. 昆虫取食和药剂熏蒸对马尾松针叶脱落酸和茉莉酸含量的影响 [J]. 应用生态学报, 2009, 20(5): 1166-1170.
- [5] 王子腾, 侯焰琪, 蒋向红, 等. 高温胁迫对‘黄冠’、‘翠玉’梨耐热生理指标及相关基因表达的影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2017, 25(1): 43-50.
- [6] 徐乐, 汪媛媛, 叶开温, 等. ABA 和 NO 在印度梨形孢提高玉米苗期抗旱性的作用 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(9): 2939-2947.
- [7] 谢静静, 王笑, 蔡剑, 等. 苗期外源脱落酸和茉莉酸减缓小麦花后干旱胁迫的效应及其生理机制 [J]. 麦类作物学报, 2018, 38(2): 221-229.
- [8] 王学府, 狄红梅, 张春风, 等. 外源激素对高温胁迫下仙客来根系活力的影响 [J]. 浙江农业科学, 2018, 59(3): 472-474.
- [9] 巩樁, 宋继玲, 甘晓燕, 等. 模拟干旱胁迫下马铃薯 *SlNCED1* 表达量及与 ABA 含量的相关性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 561-567.
- [10] TAN B C, MCCARTY D R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(22): 12235-12240.
- [11] IUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2001, 27: 325-333.
- [12] 田亚然, 薛璟祺, 赵家昱, 等. 叶子花脱落酸生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及调节开花功能初探 [J]. 西北植物学报, 2015, 35(6): 1106-1112.
- [13] 王赞, 陈丹, 岳川, 等. 茶树 *CsNCED2* 基因的克隆和表达分析 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(6): 994-1002.
- [14] QIN X. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(2): 544-551.
- [15] XU P, CAI W. Functional characterization of the *BnNCED3* gene in *Brassica napus*[J]. *Plant Sci*, 2017, 256: 16-24.
- [16] ZHANG Y C, SHEN Y J, XU X L, et al. Characteristics of the water-energy-carbon fluxes of irrigated pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd) orchards in the North China Plain[J]. *Agr Water Manage*, 2013, 128(1): 140-148.
- [17] 王华, 汪王微, 刘春旂, 等. 干旱处理下 2 个梨品种转录组差异表达基因分析 [J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(4): 61-67.
- [18] ZHAO J, LI G, YI G X, et al. Comparison between conventional indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) and simplified icELISA for small molecules[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 571(1): 79-85.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] RODRIGO M, ALQUEZAR B, ZACARÍA L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(3): 633-643.
- [21] 陆平, 田跃胜, 王名雪, 等. 枸杞脱落酸生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 303-310.
- [22] TIAN X, JI J, WANG G, et al. Cloning and expression analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene 1 involved in fruit maturation and abiotic stress response in *Lycium chinense*[J]. *J Plant Growth Regul*, 2015, 34(3): 465-474.
- [23] QIN X, ZEEVAART J A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 15354-15361.
- [24] TAN B C, JOSEPH L M, DENG W T, et al. Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family[J]. *Plant J*, 2003, 35(1): 44-56.
- [25] MELHORN V, MATSUMI K, KOIWA H, et al. Transient expression of *AtNCED3* and *AAO3* genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*[J]. *J Plant Res*, 2008, 121(1): 125-131.
- [26] ENDO A, SAWADA Y, TAKAHASHI H, et al. Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells[J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1984-1993.
- [27] 陈惠. 转基因耐盐旱稻的获得及转 *AtNCED3* 水稻的抗性研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [28] 贾娟娟, 孟秀萍, 刘蕊, 等. 拟南芥 *NCED3* 基因在水稻中的过量表达可以提高水稻的干旱胁迫耐受性 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2008, 47(3): 288-294.
- [29] WANG L, REN G, CHEN M, et al. Cloning and molecular evolution of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*NCED3*) in six species of *Glycyrrhiza* L.[J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2017, 4: 357-365.
- [30] HUANG Y, GUO Y, LIU Y, et al. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 regulates plant growth and enhances multi-abiotic stress tolerance in rice[J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 162.