

白桦 APETALA2 (AP2) 转录因子基因的分离及其表达

张妍, 刘瀛, 孙丰宾, 戴超, 刘雪梅*

(东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

关键词: 白桦; AP2; 转录表达; qRT-PCR; 花发育

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Isolation and Expression of APETALA2 Transcription Factor Gene in *Betula platyphylla*

ZHANG Yan, LIU Ying, SUN Feng-bin, DAI Chao, LIU Xue-mei

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: AP2 gene is a key transcription factor involved in flower development in plants. The full cDNA of AP2 gene was isolated from *Betula platyphylla* Suk. by methods of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). Results showed that AP2 gene contains an open reading frame (ORF) of 1554bp encoding 517 amino acids. Molecular weight of the deduced protein of *BpAP2* is 56.74kDa and the theoretical isoelectric point is 6.34. The AP2 functional sites and characterized domains were confirmed in the sequence, so the isolated gene was named as *BpAP2*, and registered in GenBank with accession number JN247408. The deduced amino acid sequence shared 51%~77% of identity with other twelve plant species, the maximum identity with *Arabidopsis thaliana* (77%) and minimum identity with *Pinus thunbergii* (51%). A phylogenetic tree was constructed according to multiple sequences alignment of all the thirteen plant species. Transcription expression of *BpAP2* was analyzed by qRT-PCR in different tissues and periods in *B. platyphylla*. Results showed that *BpAP2* was more highly expressed in floral organs than in vegetative organs, expression quantity more highly in young tissues than in mature tissues. It inferred that *BpAP2* transfactor involved in the regulation of development of floral organs and meristematic tissues in *Betula*. In addition, a natural male inflorescence-abnormal mutant of *B. platyphylla* was used for transcription analysis of *BpAP2*. Results showed that *BpAP2* gene is expressed up-regulatedly in female inflorescences, while down-regulation in male inflorescences, young leaves and young shoots, which predicted that *BpAP2* should be involved in regulation and expression of multiple genes, and not only be involved in the development of floral organs, but also play some roles in the development of vegetative tissues.

Key words: *Betula platyphylla*; AP2; transcription expression; qRT-PCR; flower development

收稿日期: 2011-07-26

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(C201040); 中央高校基本科研业务专项资金资助(DL09CA06)

作者简介: 张妍(1986—), 女, 黑龙江哈尔滨人。硕士研究生, 主要从事植物发育方面的研究。E-mail: yanyanloveyoubest@163.com

* 通讯作者: 刘雪梅(1972—), 女, 山东郓城人。副教授, 博士, 主要从事植物发育与分子生物学方面的研究。E-mail: liuxuemei@nefu.

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 是我国常见阔叶树种,用途广泛。其花单性,雌雄花均为不完全花,只有两轮花器官,雌雄同株,其雌雄花发育特殊,同年生雌雄花异熟,花期不遇,且雄花发育存在越冬宿存现象^[1]。这些不同于模式植物两性花的特征,预示着单性花发育的特殊性,具有重要的研究价值。虽然在白桦雌雄花发育的细胞学研究和分子机理研究方面已有少数报道^[2-4],但还缺乏深入系统的研究。对于该物种花器官发育的重要基因的挖掘及其功能研究具有重要意义。

AP2 基因作为成花器官的 A 类基因参与花分生组织特性建立、花器官特性的特化以及调控。AP2 基因编码 AP2/EREBP 转录因子家族,此类转录因子家族成员的主要特征是都含有至少一个 AP2 结合域,由 60 ~ 70 个左右的氨基酸组成,且高度保守,起到识别 DNA 并与之结合的作用^[5]。早在 1994 年, Jofuku K. Diane 研究小组首先发现 AP2 除了在整个拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 的花发育过程中所有 4 轮花组织和器官中有所表达外,同时也在非花组织——茎和营养叶部位表达^[6],而另一物种矮牵牛 *PhAp2A* 基因是拟南芥 AP2 基因的同源进化产物, Maes Tamara 等发现, *PhAp2A* 在花序分生组织和花蕾的初期阶段已开始表达,在花瓣的发育整个过程和幼嫩的心皮中都有较强的表达^[7]。因此,了解 AP2 基因的功能对于研究花发育的机理非常重要。

本研究以白桦作为研究对象,分离了白桦 *BpAP2* 基因的全长 cDNA,并分析了它在不同组织和发育阶段的转录表达水平,并检测了该基因在白桦雄花序突变体中各组织的表达情况,初步推测其功能,为以后系统深入研究 *BpAP2* 基因的生物学功能提供帮助和基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2010 年采自东北林业大学实验林场 20 年生白桦,由于白桦生殖发育周期比较长,并根据其雌雄花的细胞学发育特征为依据^[1],因此雌花序于 5 月 28 日至 7 月 15 日,每 12 天取材 1 次;雄花序于 7 月 15 日至 9 月 1 日,每 8 ~ 11 天取材 1 次。各组织如雌花花柄、幼叶、幼叶柄、成熟叶、成熟叶柄、幼茎、老茎(老茎用刀片刮取发育的次生木质部)取自 7 月 15 日;另于 7 月 17 日取白桦雄花突变体和野生型的雌

花、雄花、幼叶、幼茎组织,经过液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱储存。AP2 基因片段选自本研究所构建的抑制消减杂交文库的 ESTs^[8]。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

将叶片用液氮充分研磨后,加入 700 μ L 冰浴缓冲液(1.4 mol \cdot L⁻¹ NaCl, 0.1 mol \cdot L⁻¹ Tris-Cl pH 值 8.0, 0.025 mol \cdot L⁻¹ EDTA pH 值 8.0) 冰上放置 10 min, 4 °C, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 2 min 后去上清,然后采用 CTAB 法和 LiCl 沉淀法提取总 RNA^[9]。其余部位直接采用 CTAB 法提取总 RNA。

各白桦组织的总 RNA 经 DNaseI (MBI 公司) 消化除去 DNA,并用 RNA 清洁纯化试剂盒(北京盖宁金诺生物技术有限责任公司)纯化回收,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计检测其纯度及浓度。

以 5 μ g RNA 为初始材料,反转录体系:5 μ g RNA, 4.3 μ L Oligo (dT) (20 μ mol \cdot L⁻¹), ddH₂O 补足 12.5 μ L, 65 °C, 5 min, 再加入 4 μ L 5 \times Buffer, 0.5 μ L Ribonuclease Inhibitor, 2 μ L dNTP, 3 μ L 反转录酶, 42 °C, 2 h, 70 °C, 10 min 终止反应。进行 cDNA 链的合成。

1.3 白桦 AP2 基因 5' 和 3' 末端 cDNA 的扩增 (RACE)

取 2010 年 5 月 28 日的雌花做模板, AP2 基因 5' 端的扩增序列按 5' -Full RACE Kit (TaKaRa) 说明书进行操作,其 5' RACE 的特异引物 GSP1 和 GSP2 如表 1 所示。

3' RACE 的反转录体系为:总 RNA 4.5 μ L, Oligo (dT) (10 μ mol \cdot L⁻¹) 1.5 μ L, 70 °C 10 min, 冰浴 15 min, 加入 dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 2.5 μ L, RT Buffer (5 \times) 5 μ L, RTase 1 μ L, DEPC H₂O 10.5 μ L, 42 °C 恒温反应 1 h, 反转录产物 -20 °C 保存备用。

设计 3' RACE 的特异引物 GSP1 和 GSP2, 引物序列如表 1。3' RACE Outer PCR 反应体系:模板 cDNA 1 μ L, Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 2 μ L, dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Taq 酶 0.125 μ L, 3' RACE Outer Primer 1.25 μ L, 3' RACE GSP1 1.25 μ L, 去离子水补足总体积 25 μ L。3' RACE Outer PCR 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C, 1 min 30 s, 共 20 个循环, 72 °C 延伸, 10 min。3' RACE Inner PCR 反应体系与 3' RACE Outer PCR 反应体系一样, 两引物分别为 3' RACE Inner Primer 和 3' RACE GSP2。3' RACE Inner PCR 反应条件: 94 °C 3 min,

94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C, 1 min 30 s, 共 30 个循环,72 °C 延伸,10 min。

分别将 5' 和 3' RACE Inner PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收后连接到 pMD18-T 载体上,并转化 DH5 α 感受态细胞,由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

表 1 5' RACE 和 3' RACE 克隆引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
5' RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5' RACE Inner Primer	CGGGATCCACAGCTACTGATGATCACTGATG
5' RACE GSP1	AACCTCTTCCCTTGTTAGATTGCTC
5' RACE GSP2	CTGTTTCAAGTCTTCTCATAGTC
3' RACE Outer Primer	AGGATCCGCGGACTAGTGTTCCTTTTTCCTT
3' RACE Inner Primer	AGGATCCGCGGACTAGTG
3' RACE GSP1	GGTGGGAGTCTCACATATGGG
3' RACE GSP2	AAGCAAGTTTATCCTGGGTGG

1.4 白桦 AP2 基因全长 cDNA 的获得与序列分析

将测序结果利用 NCBI 网站中的 BLASTn 程序进行比对,同时通过 DNA Star 软件将以上 cDNA 片段进行拼接获得 cDNA 全长序列。以其两端序列设计特异引物扩增全长,并测序鉴定。用 BLASTx 程序进行序列同源性搜索,并用 DNAMAN 和 MEGA 4.0 软件进行多序列比对并构建其系统进化树。用 ProtParam 软件计算推导的蛋白质分子量、理论等电点。

1.5 半定量 RT-PCR

以白桦肌动蛋白 Actin 基因作为内参基因^[10],根据已有的获得的白桦 AP2 基因序列,利用 Primer 5.0 设计特异引物,由北京华大生物公司合成,引物序列如表 2。

表 2 Actin 和 AP2 引物序列

项目	引物
Actin	Up: CATCTCTGATCGGAATGGAAG
	Down: AGATCCTTTCTGATATCCACG
AP2	Up: GCAAGTTTATCCTGGGTGG
	Down: TGAAATTGATGCTGCCTCC

将白桦各组织的反转录产物稀释 20 倍作为 PCR 模板,PCR 反应体系:2 μ L cDNA,1.5 μ L 正向引物(10 μ mol \cdot L⁻¹),1.5 μ L 反向引物(10 μ mol \cdot L⁻¹),0.5 μ L dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹),2.5 μ L 10 \times Buffer,2 μ L MgCl₂,0.15 μ L Taq 酶(5 U \cdot μ L⁻¹),用 ddH₂O 补足 25 μ L 总体积。反应条件:95 °C 5 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C,30 s,共 30

个循环,72 °C 延伸,10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 GENE 全自动凝胶成像分析仪 (SYNGENE) 照相。

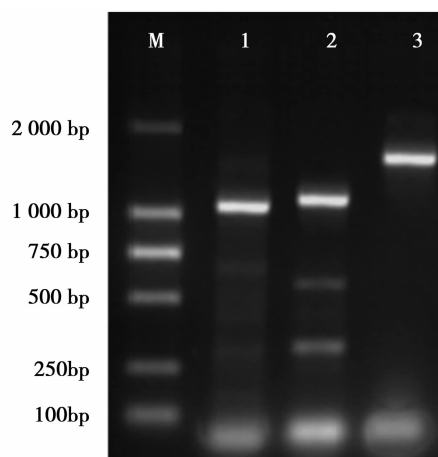
1.6 qRT-PCR

以白桦肌动蛋白 Actin 基因作为内参基因,采用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 荧光染料(东洋坊)进行 Real-time PCR 反应,体系如下:cDNA 2 μ L,Master Mix 10 μ L,正向引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L,反向引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L,用 ddH₂O 补足总体积至 20 μ L。PCR 反应在荧光定量 PCR 仪 Opticon Monitor II 上 (MJ Research DNA Engine OPTICON® Real-Time Systems) 完成,程序为 95 °C 预变性 1 min 30 s,95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,79 °C 1 s,读板。40 次循环。依文献[11]进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 白桦 AP2 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

通过 DNA Star 软件进行拼接获得 cDNA 全长序列,以其编码区两端序列设计特异引物扩增全长,并测序鉴定(图 1)。白桦 AP2 基因全长 cDNA 序列为 2 154 bp,5' 非翻译区为 432 bp,3' 非翻译区为 168 bp,开放阅读框为 1 554 bp,编码 517 个氨基酸,命名为 BpAP2,并在 GenBank 注册,登录号为 JN247408。预测编码蛋白的分子量为 56.74 kDa,理论等电点为 6.34,此蛋白为一酸性蛋白。



M:Marker DL2000,1:5' RACE 扩增结果,2:3' RACE 扩增结果,3:ORF 扩增结果

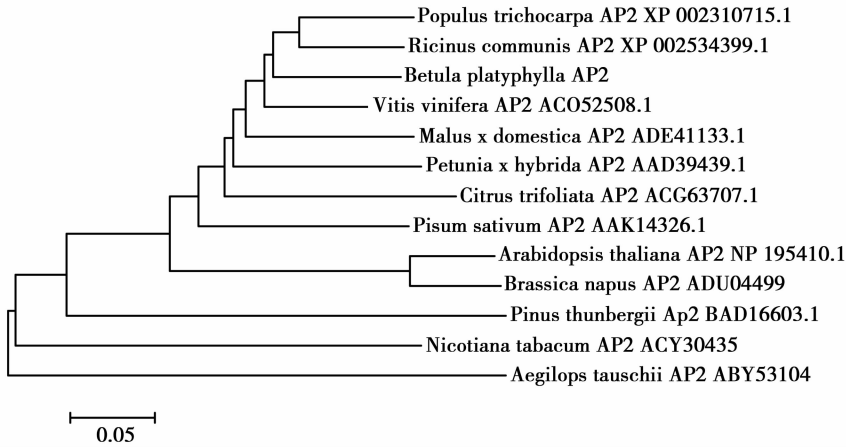
图 1 白桦 BpAP2 cDNA 全长扩增

筛选出其它 12 种植物 AP2 基因的序列,用 DNAMAN 和 MEGA4.0 进行比较分析,发现白桦与拟南芥、蓖麻、毛果杨、节节麦、烟草的相似性高达

70%以上,与葡萄、柑桔枳、苹果、矮牵牛、甘蓝型油菜的亲缘关系相似性在62%以上,与豌豆和黑松的相似性较低,分别为58%和51%。

将白桦 *BpAP2* 基因预测的氨基酸序列与其它12种植物 AP2 基因的氨基酸序列比较并构建进化树(图2),发现毛果杨与蓖麻聚为一类,在进化上显

示亲缘关系最近,并与白桦、葡萄、苹果、矮牵牛、柑桔枳、豌豆聚为一类,这为推测 *BpAP2* 的功能提供一定的线索;拟南芥与甘蓝型油菜聚为一类,然后再同以上类群聚合在一起,最后与黑松、烟草、节节麦聚在一起归于一类。其中节节麦在聚类中显示其进化属较远分枝。



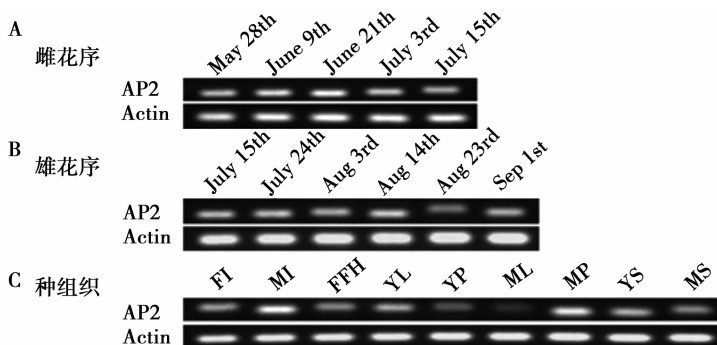
NP_195410.1:拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ADU04499:甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.), ACG63707.1:柑桔枳(*Citrus trifoliata* L.), ADE41133.1:苹果(*Malus × domestica*), AAD39439.1:矮牵牛(*Petunia × hybrida*), AAK14326.1:豌豆(*Pisum sativum* Linn.), BAD16603.1:黑松(*Pinus thunbergii* Parl.), XP_002310715.1:毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. et Groy), ACO52508.1:葡萄(*Vitis vinifera* L.), ABY53104:节节麦(*Aegilops tauschii* Coss.), ACY30435:烟草(*Nicotiana tabacum* L.), XP_002534399.1:蓖麻(*Ricinus communis* L.)。

图2 不同物种 AP2 基因的系统进化关系

2.2 白桦 *BpAP2* 基因的转录表达特征

以白桦肌动蛋白 Actin 基因作为内参基因,利用半定量及 qRT-PCR 方法对 *BpAP2* 基因进行雌雄花不同发育阶段的转录表达分析。结果表明, *BpAP2* 基因在白桦各个发育阶段中均有表达(图3. A-C),但表达量有差异(图3. B,C)。6月初至7月中旬是雌花序胚胎发育的重要阶段, *BpAP2* 在胚胎发育早期的表达量较高,并逐渐增强,6月末其表达量达到

最高,但在胚胎发育后期表达量明显降低(图4)。7月至9月是雄花序发育的重要阶段,在最初的减数分裂时期(7月15日—8月14日)表达量较高,并呈较小的降低趋势,然而在减数分裂完成后,单核小孢子发育时期(8月23日—9月1日)表达量较低,但在9月初其表达量却出乎意料地上升(图5)。可以看出, *BpAP2* 基因可能参与雌雄花各阶段的发育。



A:雌花序,5月28日至7月15日,每12天取1次样;B:雄花序,7月15日至9月1日,每8~11天取1次样;C:7月15日的雌花序(FI)、雄花序(MI)、雌花花柄(FFH)、幼叶(YL)、幼叶柄(YP)、成熟叶片(ML)、成熟叶柄(MP)、幼茎(YS)、成熟茎(MS)

图3 白桦不同时期不同组织 AP2 mRNA 水平的表达分析

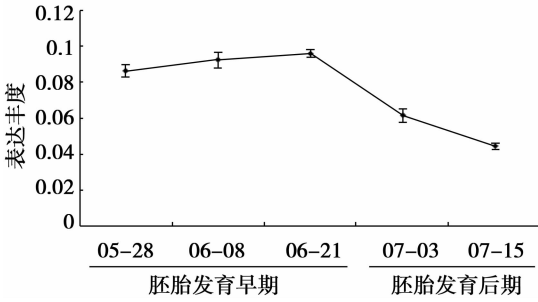


图4 白桦 *BpAP2* 基因在雌花序发育中的表达

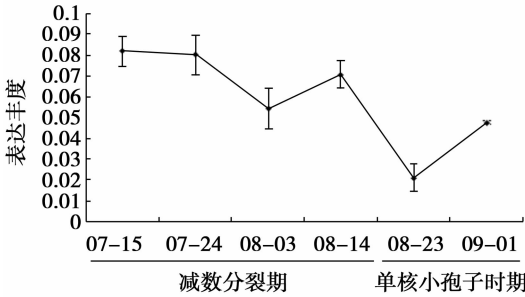


图5 白桦 *BpAP2* 基因在雄花序中的表达

另外,检测了 *BpAP2* 基因在不同组织中的表达量差异。结果显示,不同组织中 *BpAP2* 的表达量有明显差异。在雌雄花的表达量较高,且在雄花序中表达量最高,而在其它多数营养组织中表达较低(图3,图6)。另外,在幼嫩组织中有较强表达,如幼叶和幼茎高于成熟叶片和茎。但在叶柄中,却是成熟叶柄高于幼嫩叶柄(图6)。这些结果表明:*BpAP2* 基因在各组织中均有不同程度的表达,推测该基因参与各组织的发育,但其表达机制及调控发育的模式在不同组织中有所差异。

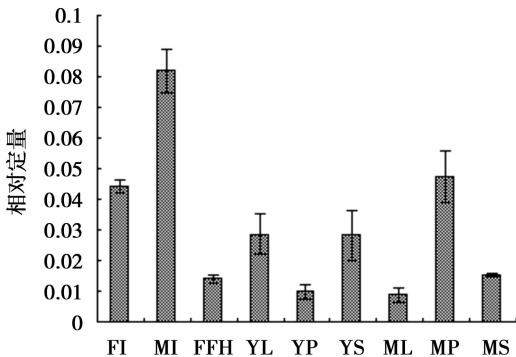


图6 白桦不同组织 *BpAP2* 的转录表达特征

为了初步研究 *BpAP2* 基因的功能,利用 qRT-PCR 技术对野生型 (WT) 白桦和雄花序突变体 (M)

进行该基因的表达比较(图7),该基因在突变植株的雄花序、幼叶和幼茎中均为下调表达,在雌花序中明显上调表达,而且在雌雄花序中的表达量和变化幅度较大,说明 *BpAP2* 基因在雌雄花发育中具有重要作用,但同时,它在突变体营养器官中表达受到抑制,可能影响了其转录调控作用。

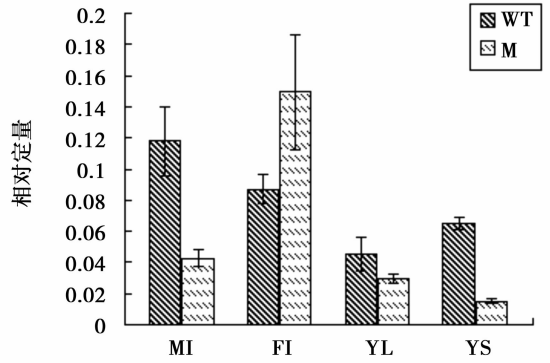


图7 白桦 *BpAP2* 基因在野生型和突变型中的转录水平分析

3 讨论

AP2 基因作为花器官的 A 类基因,是植物花发育中一类重要的参与因子,参与植物生长、发育和多种生理生化反应的信号转导^[12-13]。本研究发现白桦的 *BpAP2* 基因在花器官中的表达比其它组织较高(图6),且发育初期高于后期,推测 *BpAP2* 基因在花器官发育中起重要作用。但该基因在各营养组织中有较大的表达差异,说明 *BpAP2* 不是花器官特异表达的基因,也参与营养器官的发育。在其它植物中,AP2 基因也有类似情况。周盛梅等^[14] 分离了苹果的 *MAP2A* 基因,发现 *MAP2A* 在苹果的多种组织中表达,例如花芽、萼片、花瓣、雌雄蕊、子房和叶片,但在幼果中检测不到 *MAP2A* 基因的表达,说明 *MAP2A* 基因不仅调节花器官的发育,也参与营养组织的调控。王晨等^[15] 从葡萄中分离出 *Vv-AP2* 基因,试验证明 *Vv-AP2* 在花序和花中的表达明显高于叶和茎,说明 *Vv-AP2* 对葡萄的营养与生殖器官的发育具有不同的作用。

另外,白桦 *BpAP2* 基因在幼嫩组织(叶片和茎)中的表达要高于成熟组织(叶片和茎)(图6),估计该基因在分生组织发育中具有重要作用。Maes Tamara 等^[7] 发现矮牵牛中的 *PhAp2A* 在幼嫩器官原基中的表达均一,信号较强;随着器官成熟,在苞叶、萼片、花瓣、子房壁等器官外层中的表达强度逐渐降

低,直到消失。值得注意的是,*BpAP2* 基因在幼嫩组织中,叶柄中的表达量均低于叶片和茎,但成熟组织中却均高于叶片和茎(图6),暗示着叶柄作为叶片和茎的疏导通路,对该基因在这两种组织中的表达起着一定的调节功能。

突变体是研究基因功能的理想材料,已找到天然的白桦雄花序发育突变体,该突变体的雄花序明显异常,表现为着生部位不同,发育迟缓,形态长且细,花药初期为绿色,花药及雄配子体发育晚,小孢子发育异常,在越冬后败育,不能散粉^[16]。分析了*BpAP2* 基因在该突变体与野生型不同组织中转录水平的表达量,其结果预示*BpAP2* 基因在雌花发育中起着重要作用,在突变体的雄花、幼叶及幼茎中表达受到抑制。2004年 Shigyo Mikao^[17]从裸子植物黑松中分离出 AP2 的同系物 *PtAP2L1* 和 *PtAP2L2*,发现它们在花器官发育中起重要作用,*PtAP2L1* 在雌球花的整个发育阶段都有表达且表达强度高于雄球花和营养叶片,而 *PtAP2L2* 在雌雄球花中均有表达,在叶片中也有微量表达。植物 AP2 转录因子的这种多重功能在拟南芥中也有报道,拟南芥的 AP2 基因与胚、胚乳、种皮^[18]和雌蕊^[6, 19]发育有关,并使雄蕊数目减少^[6]及萼片转化叶结构^[20]。

除模式植物拟南芥外,研究者在其它物种中对 AP2 基因也进行了一些研究。Jing Zhuang 等^[12]从玉米中分离得到 AP2-like 基因,并在玉米的 18 种组织中检测 AP2 基因的表达,其中颖组织的表达水平最高,而糊粉层中并没有 AP2 基因的表达。*Os-AP2LP* 基因在水稻中优先在根、穗、成熟胚中表达,但在胚胎发育和幼穗中起重要的作用^[21]。*OsAP2-1* 基因在花和根中有高表达,在芽和叶中有微弱表达,其转录物在成熟的花粉中也有出现^[22]。

需要指出的是,由于白桦雌雄花的结构特征限制,选择雌雄花序进行 *BpAP2* 基因的 qRT-PCR 表达分析,尽管反映了在花序中的真实表达,但其中的花序苞片会多少影响 *BpAP2* 基因在花器官(雌蕊和心皮)中的真实表达,因此,后续研究有必要进行花器官不同组织的定位表达和更为精准的转基因功能研究。

由于 AP2 转录因子可通过不同方式与多类基因形成一定的相互作用,比如 AP2 与 AP1 是协同叠加作用^[23]、AP2 与 LFY 是相互正调作用、AP2 与 TFL 是相互负调作用^[24-25]、AP2 与 AG 是拮抗作用^[20, 26]等,这些都在花发育过程中组成了复杂的调

控网络,影响着花发育的各个环节^[19]。因此,在研究 AP2 在花发育中的作用时,应该同时关注这些基因的表达及所控制的表型变化。

更为重要的是,作为植物花发育的一个关键基因,AP2 基因的生物学功能还有待于更系统深入的研究,今后不仅仅在两性花植物中开展,如果选择单性花植物或不完全花树种进行研究,将会更全面地揭示该基因的功能及调节机制,这将是今后关注和探索的重点。

参考文献:

- [1] 刘雪梅,杨传平. 白桦雌雄花发育周期的时序特征[J]. 林业科学,2006,42(12):28-33
- [2] 刘雪梅,杨传平,耿峰. 白桦胚珠发育及胚、胚乳发育关系的研究[J]. 植物研究,2005,25(3):322-326
- [3] Lei Xing, Xue-mei Liu. Characterization of *Betula platyphylla* gene transcripts associated with early development of male inflorescence [J]. Mol Biol Rep,2011, DOI 10.1007/s11033-011-0818-y
- [4] WEI Jicheng, YANG Chuanping, WANG Chao, et al. Construction and analysis of a subtracted cDNA library of *Betula platyphylla* female inflorescence[J]. Journal of Forestry Research,2005,16(2):97-100
- [5] 闻可心,刘雪梅. AP2 功能基因在植物花发育中的重要作用[J]. 生物技术通报,2010(2):1-7
- [6] Jofuku K Diane, den Boer Bart G W, Van Montagu Marc, et al. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2[J]. The Plant Cell, 1994, 6(9):1211-1225
- [7] Maes Tamara, Van de Steene Nancy, Zethof Jan, et al. Petunia Ap2-like genes and their role in flower and seed development[J]. The Plant Cell, 2001,13(2):244-299
- [8] 闻可心. 白桦雌雄花差异表达基因的筛选及表达分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010
- [9] 曾凡锁,南楠,詹亚光. 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总的提取[J]. 植物生理学通讯,2007,43(5):913-916
- [10] 戴超,刘雪梅,周菲. 白桦基因表达半定量 RT-PCR 中内参基因的选择[J]. 经济林研究,2011,29(1):34-39
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C) (T) [J]. Methods Methods, 2001,25:402-408
- [12] Jing Zhuang, De-Xiang Deng, Quan-Hong Yao, et al. Discovery, phylogeny and expression patterns of AP2-like genes in maize[J]. Plant Growth Regul, 2010,62:51-58
- [13] Sowmya Krishnaswamy, Shiv Verma, Muhammad H Rahman, et al. Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in Arabidopsis [J]. Plant Mol Biol, 2011, 75:107-127
- [14] 周盛梅,宿红艳,王磊,等. 苹果 APETALA2 同源基因的克隆和转化研究[J]. 园艺学报,2006,33(2):239-243
- [15] 王晨,刘洪,房经贵,等. 基于 EST 数据库的葡萄 APETA-

- LA2 基因 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 207-212
- [16] 刘雪梅, 周 菲, 邢 磊, 等. 白桦雄花突变体及其细胞学特征[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(6): 1-3, 14
- [17] Shigyo Mikao, Ito Motomi. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes [J]. Development Genes and Evolution, 2004, 214(3): 105-114
- [18] Masa-aki Ohto, Sandra K Floyd, Robert L Fischer, et al. Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis* [J]. Sex Plant Reprod, 2009, 22: 277-289
- [19] 赵 奇, 王 台, 魏小弟. AP2 基因在高等植物花器官发育中的作用概述[J]. 热带农业科学, 2005, 25(3): 50-56
- [20] Irish V F. Floral development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol Biochem, 1998, 36(1-2): 61-68
- [21] MA Hao-li, ZHOU Han-lin, ZHANG Huai-yu, et al. Cloning and Expression Analysis of an AP2/ERF Gene and Its Responses to Phytohormones and Abiotic Stresses in Rice [J]. Rice Science, 2010, 17(1): 1-9
- [22] Lifeng Zhao, Shengbao Xu, Tuanyao Chai, et al. *OsAP2-1*, an AP2-like gene from *Oryza sativa*, is required for flower development and male fertility [J]. Sex Plant Reprod, 2006, 19: 197-206
- [23] Zhao Q, Wang T, Wei X D. Function of AP2 gene during floral organs development in higher plant: review [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2005, 259(3): 50-56
- [24] Kramer E M, Hall J C. Evolutionary dynamics of genes controlling floral development [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8: 13-18
- [25] Soltis D E, Ma H, Frohlich M W, et al. The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(8): 358-367
- [26] Bomblies K, Dagenais N, Weigel D. Redundant enhancers mediate transcriptional repression of AGAMOUS by APETALA2 [J]. Developmental Biology, 1999, 216(1): 260-264