

重瓣山茶花器官发育相关基因 *CjAPL1* 的全长克隆与表达分析

孙迎坤^{1,2}, 李纪元¹, 殷恒福^{1*}, 范正琪¹, 周兴文¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 青岛农业大学园林与林学院, 山东 青岛 266109)

摘要:为研究 A 功能基因在山茶花重瓣形成过程中所发挥的功能,利用同源克隆和 RACE 扩增方法,从重瓣山茶花品种‘金盘荔枝’发育早期的花芽中获得了山茶花 AP 基因全长 cDNA,命名为 *CjAPL1*, GenBank 登录号 JX657332。该基因全长 1 149 bp,其中,开放阅读框(ORF)长度为 741 bp,5'非编码区长度 206 bp,3'非编码区长度 202 bp。经氨基酸序列分析表明:*CjAPL1* 基因编码一条含有 246 个氨基酸的蛋白质,与猕猴桃、八仙花等植物的 Ap1 蛋白同源性均在 75% 以上。Real-time PCR 结果显示,*CjAPL1* 基因在‘金盘荔枝’不同发育时期花芽中的表达量为:花芽发育早 III 期 > 花芽发育早 II 期 > 花芽发育早 I 期 > 现蕾期,表达趋势表现为先逐渐升高而后急剧降低;花器官不同部位中的表达量为花柱最高,其次为子房和萼片,在雄蕊下部和外轮花上部中的表达量最低。这些差异表明,*CjAPL1* 基因可能在‘金盘荔枝’重瓣花形成中发挥作用。

关键词:山茶花;*CjAPL1* 基因;序列分析;相对荧光定量 PCR;表达

中图分类号:S781.46

文献标识码:A

cDNA Cloning and Expression Analysis of *CjAPL1* Gene from *Camellia japonica*

SUN Ying-kun^{1,2}, LI Ji-yuan¹, YIN Heng-fu¹, FAN Zheng-qi¹, ZHOU Xing-wen¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

Abstract: In order to study the role of A-class genes in the process of forming plena flower for *Camellia japonica*, a full-length cDNA sequence of *APETALA1* (*AP1*) gene was cloned from early flower bud of *C. japonica* ‘Jinpan Lizhi’ using RT-PCR and RACE, named *CjAPL1* (GenBank accession # JX657332). The results of nucleotide sequence analysis show that the length of *CjAPL1* is 1 149 bp, containing an Opening Reading Frame (ORF) of 741 bp, a 5'-Untranslated Region (5'-UTR) of 206 bp, and a 3'-UTR of 202 bp. The *CjAPL1* gene encodes a protein of 246 amino acids, and has more than 75% homology with A-class genes from *Actinidia chinensis* and *Hydrangea macrophylla*. Quantitative real-time PCR analysis shows that the gene expression pattern is that in early flower bud of III stage > early flower bud of II stage > early flower bud of I stage > squaring stage, and the tendency shows increasing slowly at the early stage and then decreasing sharply. In different floral organs, the highest expression was observed in style, next in ovary and sepals, and the lowest in bottom stamens and upper outer flowers. The difference of gene expression pattern indicates that *CjAPL1* may play a role in the morphogenesis of pleiopetalous flower of *Camellia*.

Key words: *Camellia japonica*; *CjAPL1* gene; sequence analysis; relative real-time PCR; expression

收稿日期:2012-11-01

基金项目:国家国际科技合作计划项目(2011DFA30490);国家“十二五”科技支撑计划课题(2012BAD01B07);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(RISF6141)

作者简介:孙迎坤(1977—),山东潍坊人,女,在读博士生,讲师,主要从事园林设计和观赏植物分子育种研究。

* 通讯作者:hfyin@sibs.ac.cn

山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* Linn.)植物具有重要的观赏和经济价值。本属植物具有美丽的花朵,不仅是我国的十大传统名花,也是世界名花之一,深受全世界人们的喜爱。植物花器官的发育是一个多因素影响、多条途径共同调控的过程,其中,控制花器官发育的MADS-box基因家族在高等植物的花器官发育和分化多样性等方面起着重要调控作用,成为近年来研究花器官发育的重要部分^[1-2]。

早期由Coen等^[3]提出的调控花器官发育的“ABC模型”,表明了MADS-box基因家族不同类型功能基因对花器官发育的调控作用。随着研究的逐渐深入和越来越多的花同源异型基因被发掘,该调控模型演变成了目前的“ABCDE”模型^[4-8],其中,A类基因单独调控第1轮花器官萼片的发育;A和B类基因共同调控第2轮花瓣的发育;B和C类基因一起调节第3轮雄蕊的发育;而C类基因又可以单独控制第四轮心皮发育;D类基因专一控制胚珠发育;E类基因参与调控花瓣、雄蕊、心皮和胚珠发育^[9]。*AP1*基因是植物特有的MIKC类型的MADS-box基因,具有多内含子基因结构,内含子的位置和长度保守性高^[10]。所编码的MADS-box转录因子主要由MADS-domain、K-domain、I-domain和C-terminal domain结构域共4部分结构域组成。*AP1*基因属于A类功能基因,调控萼片和花瓣发育^[11-12];同时也能和B类基因共同作用,对于花瓣数量的发育起调控作用。若*AP1*基因发生突变,可使部分花变成花序,从而导致萼片和花瓣发育异常^[13]。虽然*AP1*基因对于花器官发育起着重要的调控作用,但在囊括多种花型的山茶花(*C. japonica* Linn.)中*AP1*同源基因的研究尚未见报道。鉴于此,本研究根据已发表的*AP1*基因保守区,同源克隆了一个基因*CjAPL1*全长序列,对其进行了生物学信息分析,并对该基因在山茶花托桂型重瓣品种花芽发育的4个阶段及花

器官各组成部位的表达情况进行了相应研究,以期探讨山茶花*CjAPL1*基因的功能,为山茶花及其它观赏植物重瓣花育种提供理论及技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

用于全长扩增和荧光定量试验的材料为中国林科院亚林所茶花保存圃的山茶花托桂型品种‘金盘荔枝’(*C. japonica* ‘Jinpan Lizhi’)。于2011年11月至2012年2月采集处于不同发育状态花芽(发育早I期花芽直径 ≤ 3 mm,早II期花芽直径5 mm,早III期花芽直径8 mm、现蕾期)、花器官各部分(萼片、瓣化萼片、外轮花瓣上部和下部、内轮花瓣上部和下部、去花药的雄蕊上部和下部、瓣化雄蕊、花柱、子房),包裹于锡箔纸中,经液氮速冻后带回实验室,置于 -80 °C冰箱待用。

植物总RNA提取试剂盒RNAout 1.2购自天泽基因(北京)公司,提取RNA所需的物品等也经该公司生产的RNAase固相清除剂按说明书处理后使用。cDNA第一链合成试剂盒和T4 DNA连接酶皆购自Fermentas公司(加拿大)。常用的限制性内切酶、高保真酶Prime STAR HS DNA聚合酶、大肠杆菌*E. Coli* DH5 α 、荧光定量反转录试剂盒和染料法PCR反应SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II均购自TaKaRa公司(大连)。凝胶回收试剂盒和质粒微量提取试剂盒购自Axygen公司(美国),PCR扩增引物由生工生物工程有限公司(上海)和鼎国生物公司(北京)合成,测序由华大基因公司(杭州)完成。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中的*AP1*同源基因的完整mRNA序列和CDS信息,参考周兴文等^[15]的实验方法,分别设计基因保守区正向和反向引物P-1、P-2,3’ RACE和5’ RACE扩增特异引物GSP1、GSP2,cDNA全长特异引物P-3、P-4(表1)。

表1 山茶花*CjAPL1*基因克隆及表达分析所设计的引物

| 引物名称 | 引物序列(5'-3') | 用途 |
|-------|---------------------------|-----------|
| P-1 | TTTCTTATTGGGGTCTTTG | 保守区片段序列扩增 |
| P-2 | TGAAGCTCTTTAGGGCTCAT | |
| GSP1 | CCTGCATGGAAAGGATTCTTGAGCG | 3’RACE扩增 |
| GSP2 | CCTGCATGGAAAGGATTCTTGAGCG | 5’RACE扩增 |
| P-3 | GGAGACCAAGAAAACAAGAGAGAA | 全长序列扩增 |
| P-4 | CCTGAAACTTATCCATTGATGTGAC | |
| 18S-1 | GACTCAACACGGGAAACTTACC | 内参基因扩增 |
| 18S-2 | CAGACAAATCGCTCCACCAAC | |
| Y-1 | ATCGCTCTCATCTTCTCCACCA | 荧光定量PCR |
| Y-2 | TATCGCTCAAGAAATCCTTCCATGC | |

1.2.2 ‘金盘荔枝’*CjAPL1* 基因 cDNA 全长扩增

‘金盘荔枝’各部位花器官总 RNA 提取根据植物 RNAout1.2 试剂盒说明书进行操作,cDNA 全长扩增参考周兴文等^[14]的实验方法进行。

1.2.3 *CjAPL1* 基因编码蛋白质的生物信息学分析

利用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 提供的在线 Blast 进行 *CjAPL1* 基因同源序列比对分析等,采用 ORF Finder 在线查找该基因 cDNA 开放阅读框 (opening reading frame, ORF)。利用 Prot-Param 软件 (瑞士生物信息学研究所, <http://cn.expasy.org>) 进行 *CjAPL1* 基因编码蛋白质的生物信息学在线分析,包括蛋白质的相对分子量、氨基酸残基数目和组成、理论等电点、稳定性等参数;利用 HNN、ProtScale 等软件分析 *CjAPL1* 基因编码蛋白质的 α -螺旋、 β -转角、延伸链、无规则卷曲及疏水性等^[15]。应用 Swiss-model 网站 (<http://www.expasy.org/swissmod>) 提供的同源建模系统预测蛋白质的相应三维结构。利用 DNAMAN 软件进行基因 cDNA 全长序列的拼接、氨基酸序列比对及系统发育树构建等研究^[16]。

1.2.4 *CjAPL1* 基因在‘金盘荔枝’花器官各部位中的荧光定量表达

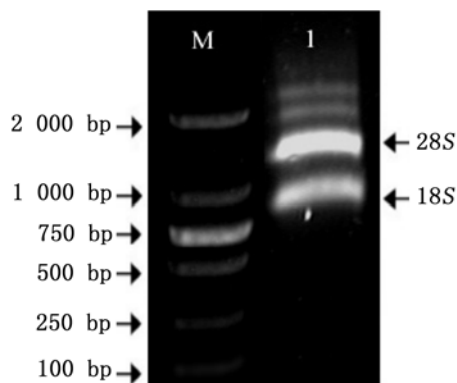
用植物 RNAout1.2 试剂盒提取‘金盘荔枝’4 个不同发育时期花芽以及萼片、瓣化萼片、花瓣、瓣化雄蕊、雄蕊、花柱、子房等的总 RNA,然后各取约 800 mg 用反转录酶合成 cDNA 第一链。根据已知的 *CjAPL1* 基因全长序列,设计荧光定量引物 Y-1 和 Y-2,扩增得到的特异片段长度为 83 bp。以山茶花的 18S *rRNA* (U42815.1) 作内参基因,并设计内参特异引物 18S-1 和 18S-2。荧光定量反应试剂采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II,仪器为 ABI 7300 Real-time PCR (美国),采用 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 31 s,40 个循环的反应程序。每个试验和样品各设 3 次重复,利用 ABI 7300 Real-time PCR 相应软件、Excel 2003 软件和 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 ‘金盘荔枝’RNA 提取及 *CjAPL1* 基因全长 cDNA 的获得

‘金盘荔枝’花芽发育早期总 RNA 提取见图 1,28 S 亮度约为 18 S 的 2 倍,且条带亮度高于分子量标准 750 bp 的条带,表明提取的总 RNA 完整,质量和浓度较高,可以用于后续试验。

采用同源克隆方法,根据 AP 同源基因保守区设



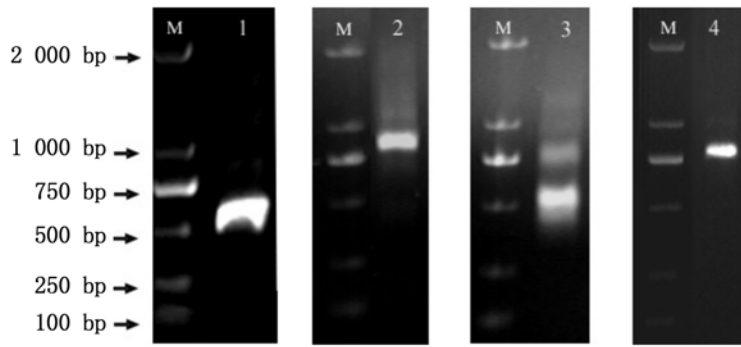
M:分子量标准 DL2000;1:RNA 样品

图1 ‘金盘荔枝’发育早期花芽总 RNA 提取

计引物 P-1、P-2 (表 1),以‘金盘荔枝’cDNA 为模板进行 PCR 扩增,转化 *E. Coli* DH5 α 后,挑取 5 个单菌落测序,获得 3 个相同的目的片段,长度为 575 bp (图 2)。将该片段所编码的蛋白进行 NCBI 在线比对,发现其与牵牛花 (*Pharbitis nil* (Linn.) Choisy)、油梨 (*Persea americana* Mill.)、腊梅 (*Chimonanthus praecox* (L.) Link) 等多个物种 Ap1 基因编码的蛋白有大于 80% 的同源性。根据得到的同源特异片段和引物 GSP1、GSP2 进行扩增,分别转化 *E. Coli* DH5 α 后,依次挑取 7 个和 5 个单菌落测序,各得到含有相同序列的‘金盘荔枝’*CjAPL1* 基因的 3’末端序列 5 个克隆和 5’末端序列 4 个克隆,与所得中间 cDNA 目的序列拼接,得到 1 149 bp 的序列全长,将此基因命名为 *CjAPL1*,GenBank 登录号为 JX657332。根据电子拼接 *CjAPL1* 基因序列全长和得到的开放阅读框信息及 3’和 5’UTR 端的特异扩增引物,PCR 扩增后得到目的基因序列,测序结果表明所得的 774 bp 全长序列与 *CjAPL1* 基因拼接结果一致。

2.2 ‘金盘荔枝’*CjAPL1* 基因 cDNA 核苷酸序列分析

采用 ORF Finder 分析 *CjAPL1* 基因序列,结果表明:该基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 741 bp,5’非编码区长度 206 bp,3’非编码区长度 202 bp,终止密码子为 TAA,全长序列包含 Poly (A) 结构。以上结果表明:所克隆到的 *CjAPL1* 基因序列是一条完整的基因序列 (图 3)。在 NCBI 网站上的序列比对分析表明:该基因与垂枝桦 (*Betula pendula* Roth)、牵牛花、苹果 (*Malus domestica* Borkh.)、碧桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch) 等多个物种的 MADS 基因的相似性达 80% 以上。



M:分子量标准 DL2000;1:基因特异片段;2:3' RACE 扩增产物;
3:5' RACE 扩增产物;4:基因全长扩增产物
图2 ‘金盘荔枝’ CjAPL1 基因扩增电泳

```

207 atggggagaggaagagtccagctgaagaggatcgagaacaagatc
    M G R G R V Q L K R I E N K I
927 attagtcacatcaatggataa 947
    I S H I N G *
1121 GTTGTA AAC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
    
```

第1行前3个碱基为起始密码子,第2行后3个碱基为终止密码子,第3行显示 Poly(A) 结构
图3 CjAPL1 基因 cDNA 核苷酸序列分析

2.3 ‘金盘荔枝’ CjAPL1 基因编码的蛋白质结构及功能位点分析

利用 Primer 5 和 ORF Finder 分析 CjAPL1 基因的 207~947 bp 之间的开放阅读框,表明其编码一条含有 246 个氨基酸的蛋白质。ProtParam 在线分析显示:该蛋白的分子量为 28.247 1 kD,原子总数 3 987,分子式为 C₁₂₂₃ H₂₀₀₅ N₃₆₉ O₃₈₂ S₈,理论等电点 (PI) 为 8.93,平均亲水指数为 -0.771,不稳定系数为 49.07,确定 CjAPL1 基因编码的蛋白为不稳定亲水性蛋白。

山茶花 CjAPL1 基因编码蛋白质二级结构以 α-螺旋为主,占 51.63%;其次为无规则卷曲,达 36.59%;延伸链结构占 11.79%;缺少 β-转角等其它区域,这与山茶花植物的 B 功能基因编码蛋白的结构预测结果类似^[17]。蛋白质的空间结构很大程

度上可以决定其功能。CjAPL1 基因预测的编码蛋白质三级结构与二级结构预测结果相吻合(图4)。利用 NCBI 网站进行保守域在线分析,结合同类型基因的比较,发现 CjAPL1 基因编码的蛋白属于典型的 Type II 类型的 MADS-box 蛋白(图5)。



图4 CjAPL1 基因推导的编码蛋白质三级结构

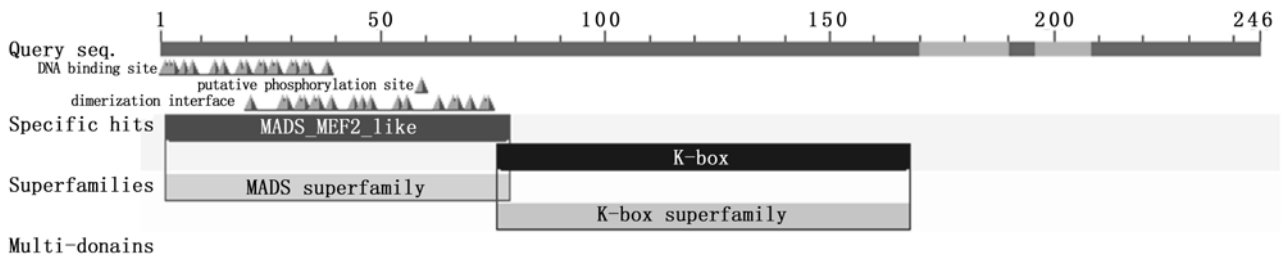
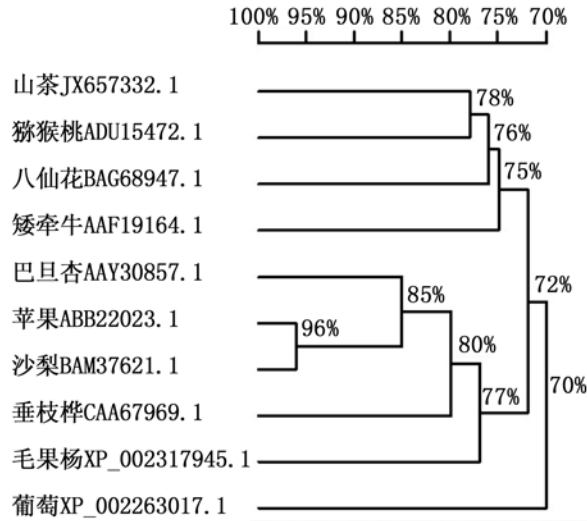


图5 CjAPL1 基因编码蛋白的保守域分析

2.4 ‘金盘荔枝’ *CjAPL1* 基因编码蛋白序列多重比对与同源性分析

应用 DNAMAN 分析软件对山茶花及其它物种的 Ap1 蛋白编码的氨基酸序列进行比对,发现‘金盘荔枝’*CjAPL1* 蛋白与已知其它物种的 Ap1 蛋白序列同源性很高(图 6),其中,该蛋白序列与猕猴桃

(*Actinidia chinensis* Planch)、八仙花(*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.)的同源性达 75% 以上,且与猕猴桃科(Actinidiaceae)的猕猴桃同源性最高,原因是猕猴桃科最初是与山茶花同属五桠果科(Dilleniaceae)^[18],这也说明了 Ap1 基因在相近科属物种进化上的保守性较高。



物种学名:矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.), 巴旦杏(*Prunus dulcis* (Mill.) D A Webb), 沙梨(*Pyrus pyrifolia* (Burm. F) Nakai), 毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray), 葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)

图 6 *CjAPL1* 基因编码蛋白与其它物种同源性比较

2.5 ‘金盘荔枝’ *CjAPL1* 基因在花器官中的表达分析

2.5.1 *CjAPL1* 基因在不同发育时期花芽中的表达

选取山茶花的 18S *rRNA* 基因作为内参基因,运用 Real-time PCR 的方法对‘金盘荔枝’4 个发育时期花芽中 *CjAPL1* 基因的表达情况进行测定(图 7)。由图 7 可见:*CjAPL1* 基因在花芽发育早 III 期(直径约 8 mm)的相对表达量最高,相当于花芽发育早 I 期(直径约 3 mm)的 23 倍左右;其次为花芽发育早 II 期(直径约 5 mm),在花芽发育早 I 期和现蕾期的相对表达量最低。该基因在此物种中的表达趋势为先渐次升高而后急剧降至最低。

2.5.2 *CjAPL1* 基因在花器官各组成部位中的表达

CjAPL1 基因在‘金盘荔枝’花器官不同部位的表达情况采用 Real-time PCR 的方法进行测定,结果见

图 8。*CjAPL1* 基因在花柱中的相对表达量最高,其次为子房和萼片部位,在雄蕊下部和外轮花上部中的相对表达量最低。

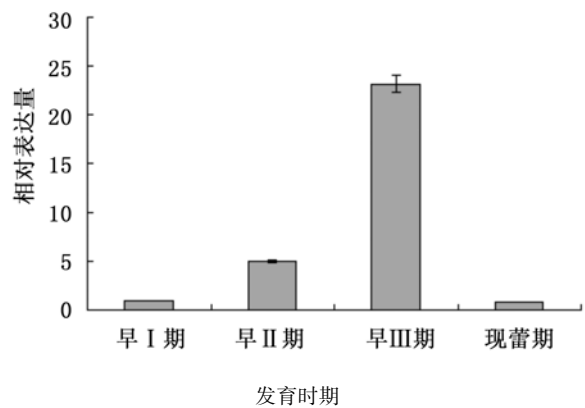
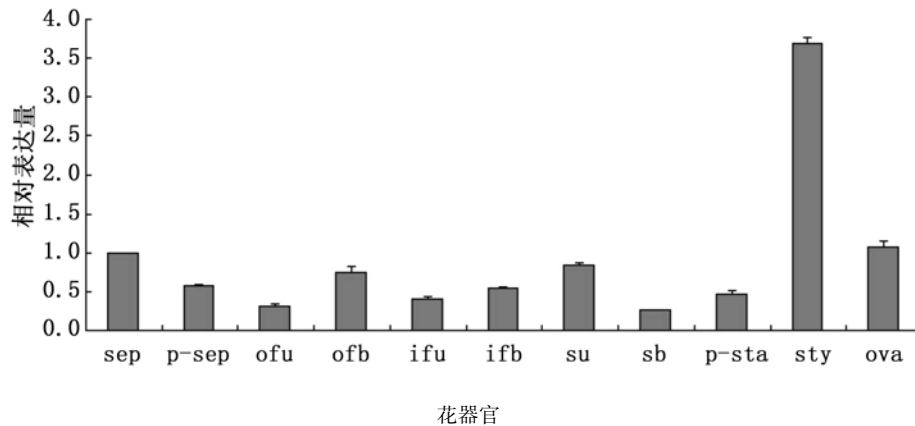


图 7 *CjAPL1* 基因在‘金盘荔枝’花芽不同发育时期的相对表达量



sep: 萼片; p-sep: 瓣化萼片; ofu: 外轮花瓣上部; ofb: 外轮花瓣下部; ifu: 内轮花瓣上部; ifb: 内轮花瓣下部; su: 雄蕊上部; sb: 雄蕊下部; p-sta: 瓣化雄蕊; sty: 花柱; ova: 子房

图8 ‘金盘荔枝’花器官不同部位 *CjAPL1* 基因的相对表达量

3 结论与讨论

采用同源克隆和 RACE 扩增方法,从山茶花托桂型重瓣花品种‘金盘荔枝’的发育早期花芽中获得了山茶花 *AP* 同源基因 *CjAPL1* 全长, GenBank 登录号 JX657332。核苷酸序列分析显示: *CjAPL1* 基因全长 1 149 bp, 其中, 开放阅读框长度为 741 bp, 5' 非编码区长度 206 bp, 3' 非编码区长度 202 bp。对其氨基酸序列分析结果表明: 此基因编码 1 条分子量为 28.247 1 kD、含有 246 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质的二级结构以 α -螺旋为主, 占 51.63%; 其次为无规则卷曲和延伸链, 不存在 β -转角等其它区域, 这与山茶花植物的 B 功能基因所编码的蛋白结构预测结果相似^[17]。同时, 预测的编码蛋白质三级结构与二级结构预测结果相符, *CjAPL1* 基因编码的蛋白属于典型的 Type II 类型的 MADS-box 蛋白。山茶花 *CjAPL1* 蛋白与近缘的猕猴桃科、八仙花科 (Hydrangeaceae) 等植物的 AP1 支系同源基因氨基酸序列相似性高于 75%, 表明 AP1 基因在相近科属物种的进化上的保守性较高; 但不同的科属植物间的 AP1 同源基因序列又存在趋异分化现象, 表明 AP1 同源基因在植物的进化中既保守又有所发展。

采用荧光定量 PCR 的方法对‘金盘荔枝’不同发育时期花芽中 *CjAPL1* 基因的表达分析表明: 该基因在花芽发育早 III 期的相对表达量最高, 其次为花芽发育早 II 期, 在花芽发育早 I 期和现蕾期的相对表达量最低, 整个表达趋势为先渐次升高而后急剧降低。这表明随着山茶花花芽形态的逐步形成, *CjAPL1* 基因的表达相应上升, 至花芽发育成熟后达

到最大表达量, 然后在不同花器官中进行差异表达。‘金盘荔枝’不同花器官中 *CjAPL1* 基因的表达情况为, 花柱中的相对表达量最高, 其次为子房, 且在雄蕊下部和外轮花上部中的相对表达量最低。 *CjAPL1* 基因在萼片、花瓣下部、雄蕊上部和子房中的表达量较高, 这与 A 类基因调控萼片和花瓣发育有关, 内外花瓣下部的表达量皆高于上部, 表明 *CjAPL1* 基因很可能是在萼片演变成花瓣的过程中发挥作用, 并且为基部起源型。同时, 根据花器官发育四重奏模型理论, *CjAPL1* 基因在雌蕊、雄蕊上部和子房中存在的较高表达, 很可能促进了 *PI/AP3*、*STK* 和 *SEP* 类基因在花器官中的表达, 导致基因在除萼片外的其它部位也高表达, 这也说明 A、B、D 和 E 类基因间可能存在相互促进表达的作用^[19]。根据花器官发育模型理论, *CjAPL1* 基因的表达应该能够抑制 *AG* 类基因的表达, 但在此实验中 *CjAPL1* 基因在雄蕊上部和子房中也存在较高的表达, 朱高浦^[17]克隆到的 B 功能基因 *GLO2* 在‘红露珍’ (*C. japonica* ‘Hongluzhen’)、*DEF* 和 *TM6* 在‘金盘荔枝’中的表达也存在类似情况, 可能与山茶花特殊性或重瓣型特征有关。赵印泉等^[20]认为, 山茶花重瓣花的形成归于雌雄蕊起源方式, 张宏达等^[21]也研究了山茶花中普遍存在的萼片瓣化现象, *CjAPL1* 基因在萼片中的高表达进一步说明了萼片起源是山茶花重瓣花型的来源方式之一。 *CjAPL1* 基因的表达存在部位差异性和基因相互作用的现象, 为重瓣花的形成提供了理论基础, 也揭示了植物花器官发育多途径调控的可能性^[22-23]。

李贵生^[24]采用原位杂交方法对金粟兰 (*Chlo-*

ranthus spicatus (Thunb.) Makino) *CsAP1* 基因进行了分析,该基因在金粟兰的穗状花序原基上(包括苞片、花、雄蕊和心皮原基)、花粉囊和胚珠中表达强烈,在周边的组织中(苞片、雄蕊裂片和心皮)少量表达^[24]。这说明 *APL1* 的表达模式与 *AP1* 类基因类似,可能是在诱导花分生组织的形成过程中发挥作用,这也与对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 的 *AP1* 型基因(分别为 *AP1* 和 *SQUAMOSA*(*SQUA*))的研究结果基本相符^[25]。此外,枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 和苹果中的 *AP1* 同源基因在腋芽、花蕾、花和幼果等繁殖器官中均有表达,表明 *AP1* 类基因可同时参与植物的营养生长和生殖器官发育^[26-27]。本试验成功克隆了山茶花的 *CjAPL1* 基因,对其所编码的蛋白质结构进行了功能预测,并对该基因在‘金盘荔枝’花器官中的时空表达量进行了研究。对山茶花 *CjAPL1* 基因的分析及进一步研究该基因的功能可为山茶花花型的分子育种提供相关的理论依据,并有助于揭示山茶花重瓣花形成的原因。

参考文献:

- [1] Hu J Y, Saedler H. Evolution of the inflated-calyx-syndrome (ICS) in *Solanaceae*[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(11):2443-2453
- [2] Viaene T, Vekemans D, Irish V F, et al. Pistillata-duplications as a mode for floral diversification in (Basal) asterids [J]. *Mol Biol Evol*, 2009, 26(11):2627-2645
- [3] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353(6339):31-37
- [4] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes[J]. *Nature*, 2000, 405(6783):200-203
- [5] Theissen G, Saedler H. Floral quartets [J]. *Nature*, 2001, 409(6819):469-471
- [6] Ditta G, Pinyopich A, Robles P, et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(21):1935-1940
- [7] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl):1-17
- [8] 徐 勇. 桃花发育相关 MADS box 基因研究 [D]. 北京:首都师范大学, 2007:23
- [9] Colombo L, Franken J, Koetje E, et al. The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(11):1859-1868
- [10] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3):464-489
- [11] Mandal M A, Yanofsky M. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1995, 377(6549):522-524
- [12] Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic-gene, *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, 360(6401):273-277
- [13] Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, et al. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting gene [J]. *Development*, 1993, 119(3):721-743
- [14] 周兴文, 李纪元, 范正琪, 等. 金花茶查尔酮异构酶基因全长克隆与表达的初步研究 [J]. *林业科学研究*, 2012, 25(1):93-99
- [15] 朱高浦, 李纪元, 范正琪, 等. 完全重瓣型山茶花品种‘红十八学士’*CjHDEF* 基因 cDNA 的序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2011(2):98-102
- [16] 朱高浦, 李纪元, 范正琪, 等. 完全重瓣型山茶花品种‘红十八学士’*CjHTM6* 基因 cDNA 的克隆与分析 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32(3):456-462
- [17] 朱高浦. 山茶花 MADS-BOX 家族 B 类基因克隆及在重瓣花形成中的作用 [D]. 北京:中国林业科学研究院, 2011:32-36
- [18] 邢 勇. 猕猴桃科植物的系统发育 [J]. *教学与管理*, 1987(4):102-104
- [19] Thomas J. Relearning our ABCs; new twists on an old model [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(7):370-376
- [20] 赵印泉, 刘青林. 重瓣花的形成机理及遗传特性研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29(4):832-841
- [21] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第四十九卷第三分册 山茶科(一) 山茶亚科 [M]. 北京:科学出版社, 1998
- [22] Kramer E M, Hall J C. Evolutionary dynamics of genes controlling floral development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1):13-18
- [23] Immink R G H, Ferrario S, Busscher-Lange J, et al. Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family [J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 268(5):598-606
- [24] 李贵生. 金粟兰花器官特征基因 *CsAP1*、*CsAP3* 和 *CsSEP3* 的结构、表达和进化研究 [D]. 北京:中国科学院研究生院, 2005:47-48
- [25] Lowman A C, Purugganan M D. Duplication of the *Brassica oleracea* *APETALA1* floral homeotic gene and the evolution of domesticated cauliflower [J]. *Hered*, 1999, 90(5):514-520
- [26] 孙海峰, 孟玉平, 曹秋芬, 等. 枣中 *APETALA1* (*AP1*) 同源基因的克隆及其表达特征分析 [J]. *山西大学学报:自然科学版*, 2009, 32(2):266-272
- [27] Yao J, Dong Y, Kvarnheden A, et al. Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1999, 124(1):8-13