

过表达高粱 *SbAGL6* 基因对拟南芥花期转换的影响

傅 扬, 丁 博, 罗 峰, 吕芳芳, 谢晓东, 孙守钧

(天津农学院 农学系, 天津 300384)

摘要:以甜高粱品种 Roma 为试验材料,在生物信息学分析基础上,采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法,克隆了 *SbAGL6* 基因的编码区序列。序列分析表明,*SbAGL6* 基因编码具有 256 个氨基酸的转录因子,在其 N 端含有 MADS-box 结构域,中间存在 K-box 结构域,与拟南芥 *AtAGL6* 等直系同源基因在核苷酸和氨基酸序列上都有较高的相似性。为验证其生物学功能,采用 Gateway 的方法,构建了 *SbAGL6* 基因的可诱导过表达载体。利用农杆菌介导侵染拟南芥的方法,获得了 *SbAGL6* 基因的转基因拟南芥植株,并对其进行了功能鉴定。结果表明,未施加诱导物地塞米松 Dex 时,转基因拟南芥与野生型生长一致,而施加 DEX 后,转基因植株比野生型提早开花,*SbAGL6* 基因在调控植物花期转换中发挥了作用。

关键词:高粱;*SbAGL6*;拟南芥;花期转换

中图分类号:S514 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0022-05

Effects of Overexpression of *SbAGL6* Gene on Floral Transition in *Arabidopsis* Plants

FU Yang, DING Bo, LUO Feng, LÜ Fang-fang, XIE Xiao-dong, SUN Shou-jun

(Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: Floral transition is a crucial stage for establishment of life cycle and agronomic traits in sorghum. But the mechanism underlying this biological process remains largely elusive. In this study, we cloned the coding sequence of putative *SbAGL6* genes from sorghum cultivar, Roma, by in silico sequence analysis and reverse-transcription PCR. The DNA sequence alignment revealed that *SbAGL6* gene encoded a transcription factor with 256 amino acids which included a MADS-box domain in the N-terminal and a K-box domain in the middle. *SbAGL6* gene shared high sequence similarity with *AtAGL6* gene, indicated the functional similarity between two genes. To clarify the biological functions of *SbAGL6* gene, we constructed an inducible over-expression vector for *SbAGL6* based on Gateway cloning technology, and transformed *SbAGL6* over-expression cassette into *Arabidopsis* plants. The phenotypic analysis demonstrated that transgenic plants flowered earlier than the wild type after application of inducer Dexamethasone (Dex). But transgenic plants would show no difference from wild type plants under mock treatment. These results supported our proposition that *SbAGL6* gene might play an important role in controlling flowering time in sorghum.

Key words: Sorghum; *SbAGL6*; *Arabidopsis thaliana*; Floral transition

植物的花期转换过程受一系列转录因子的调控。对模式植物拟南芥的研究揭示, MADS 转录因子在这一生物学过程中发挥重要调控作用。MADS 盒转录因子基因家族有 107 个成员, 但人们对其中多数基因的功能尚不了解。通过进化树分析, 这些 MADS 盒基因被划分为 5 个亚家族(称为 M α 、M β 、M γ 、M δ 和 MIKC)^[1-3]。与开花有关的 MADS 盒基

因全部属于 MIKC 亚家族。*AGL6* 及其同源基因属于 MIKC 亚家族的 AP1/AGL9 组。在酵母菌双杂交系统中, 蛋白-蛋白互作图谱显示拟南芥 MIKC 亚家族 MADS 盒蛋白各具有特异的蛋白互作模式, 其中 *AGL6* 与 *API* 和 *SEPs* 的蛋白互作模式相似, 说明 *AGL6* 与 *API* 和 *SEPs* 具有相似的功能^[2,4]。*AGL6* 及其同源基因已从不同种类的植物中得以克隆, 如

收稿日期: 2014-02-03

基金项目: 天津市科技支撑计划项目(12ZCZDNC00100)

作者简介: 傅 扬(1988-), 女, 天津人, 在读硕士, 主要从事高粱遗传改良研究。

通讯作者: 孙守钧(1961-), 男, 山东文登人, 教授, 博士, 主要从事饲用作物遗传改良研究。

挪威云杉^[5]、辐射松^[6]、矮牵牛^[7]、水稻^[8]、玉米^[9]、麻竹^[10]、文心兰^[11]、小麦^[12]、黑麦草^[13]。迄今为止,对它们的功能和作用机制却了解甚少。目前在基因序列、表达模式方式上,以及 *AGL6* 类基因的转化表型,都说明 *AGL6* 类基因参与了开花诱导和花器官发育。现有的解释花器官发育的分子机制是 ABCDE 模型,在正常花器官发育的过程中,存在 A、B、C、D、E 5 类花器官特征基因,A 类[如 *APETALA1* (*API*)]、E 类[如 *SEPALLATA1/2/3/4* (*SEPI/2/3/4*)]基因同时控制萼片的发育;A、B[如 *APETALA3* (*AP3*)]、E 类基因同时控制花瓣发育;B、C[如 *AGAMOUS* (*AG*)]、E 类基因同时控制雄蕊发育;C、E 类基因同时控制心皮发育;D[如 *SEEDSTICK* (*STK*)]、E 类基因同时控制胚珠发育。这 5 类控制花发育基因中均没有涉及 *AGL6* 类基因,因此,对 *AGL6* 类基因功能和作用机制的研究,将会使花发育的 ABCDE 模型更加完善。

高粱在农业生产中有广泛的用途,花期转换特性是高粱个体发育和农业生产应用研究中关注的重要性状。但目前对高粱开花诱导的调控机制知之甚少,因而很难进行优异材料的分子标记辅助选择育种和相关基因的遗传转化,制约了对高粱开花期性状的遗传改良。本研究对 *AGL6* 基因进行分析,研究该基因的生物学功能,为解析高粱开花的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

本试验所采用的植物材料为甜高粱品种 Roma [*Sorghum bicolor* (L.) Moench],转基因植物材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.),生态型为 Columbia。

本试验所用的大肠杆菌为 DH5 α (天津-布里斯托研究中心保存),农杆菌菌株为 GV3101 (天津-布里斯托研究中心保存);克隆载体为 pGEM-T easy (购自 Promega),表达载体为 pDONR (amp) 和 pKIGW (天津-布里斯托研究中心保存),植物总 RNA 的提取采用 TIANGEN 试剂盒,cDNA 的合成使用 Invitrogen 的 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR,测序在北京博迈德有限公司完成。

1.2 引物设计

以模式生物的 *AGL6* 序列作为查询序列,检索高粱数据库,以得到的序列为基础,设计上游引物 *SbAGL6*-F:5'-ATGGGGAGGGGACGAGTTGAG-3',下游引物 *SbAGL6*-R:5'-TCAAAGAACCCATCCCAGC-3'。

1.3 植物总 RNA 提取及目的基因克隆

对高粱叶片取材后液氮冷冻,储藏在 -80 ℃ 冰箱中备用。总 RNA 提取和 cDNA 合成均按说明书进行。以反转录获得的 cDNA 为模板,*SbAGL6*-F、*SbAGL6*-R 为引物进行 PCR 扩增,反应体系为 cDNA 模版 0.3 μ L,10 \times Taq Buffer 1 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L,10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L,ddH₂O 7.4 μ L,反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分离后回收纯化,回收片段连接到 pGEM-T easy 载体上,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,挑选阳性克隆进行测序。

1.4 同源性分析

cDNA 测序在北京博迈德完成;cDNA 序列在 GenBank 进行 BLAST 搜索和同源性比较。cDNA 序列的翻译及氨基酸比对使用 DNAMAN 软件。

1.5 表达载体构建

本试验采用 Invitrogen 的 Gateway 技术构建过表达载体。根据基因 *SbAGL6* 的 ORF 序列,将 Gateway 技术中的 AttB 位点加入原始引物序列,从阳性克隆的质粒中扩增出 ORF 片段,用于构建表达载体。以通过测序鉴定的质粒为模板,AttB-*SbAGL6* F 和 AttB-*SbAGL6* R 为引物进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳后回收 PCR 产物。利用得到的 AttB-*SbAGL6* 产物进行 BP 反应,产物经转化后对阳性克隆进行测序。将鉴定正确的质粒进行 LR 反应,进行转化和酶切检测,将鉴定正确的菌液用于测序。

1.6 农杆菌介导的拟南芥转化

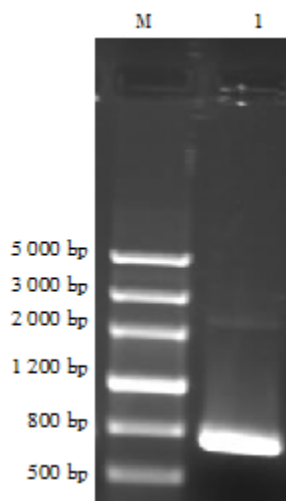
用拟南芥蘸花法转化,按常规方法培育植株到结实,收获 T₀ 种子后进行 PCR 鉴定,通过鉴定的植株分别单株收获种子。将获得的 T₁ 种子播于含有合适浓度卡那霉素的 1/2MS 培养基上,出苗后观察阴性幼苗和阳性幼苗的比例,此后将正常生长的植株分单株收获 T₂ 种子。将 T₂ 转化株种子和野生型种子同时种植在 1/2MS 培养基中,14 d 后分别移到加有诱导物 Dexamethasone (Dex) 的 1/2MS 培养基中进行诱导处理,观察转基因植株的生长变化。

2 结果与分析

2.1 高粱 *SbAGL6* 基因的克隆

以高粱叶片 cDNA 为模板,*SbAGL6*-F、*SbAGL6*-R 为引物进行 RT-PCR 扩增,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到一条大约 800 bp 的单一一条带,同目的产物的大小一致(图 1),将目的片段连接到 pGEM-

T easy 载体,获得重组质粒 pGEM-T easy-*SbAGL6*,经测序表明该片段长 768 bp。利用 NCBI 中相关软件进行搜索,其与高粱同源性较高,命名为 *SbAGL6*。



M. DNA Marker IV (Biomed); 1. 目的基因 *SbAGL6* (768 bp)。
M. DNA Marker IV (Biomed); 1. Target gene *SbAGL6* (768 bp)。

图1 *SbAGL6* 基因 ORF 的 RT-PCR

Fig. 1 RT-PCR to acquire the target gene *SbAGL6*

2.2 *SbAGL6* 基因的测序与序列分析

根据拟南芥的相关信息,在 NCBI 网站上搜索高粱的相关基因,得到高粱 *SbAGL6* 的 cDNA 全基因的最大开放阅读框(ORF) 序列大小为 768 bp,编码

具有 256 个氨基酸的蛋白质(图 2)。结果表明,所扩增的 *SbAGL6* 基因全序列与预测的 *SbAGL6* cDNA 全序列 99% 相似,证明扩增的片段符合预期的结果(图 2)。将 *SbAGL6* 的氨基酸序列提交到 NCBI 进行保守域分析,发现 N 端存在 MADS 结构域,中间存在 K-box 结构域(图 3)。

经 ProtParam 工具计算,*SbAGL6* 基因编码的蛋白质理化性质参数为:分子质量为 29.029 9 kDa,理论等电点 pI 为 8.92,脂肪族指数为 77.73。各氨基酸在该蛋白质中的个数及所占比例见表 1,其中带正电荷的氨基酸残基的总个数为 (Arg + Lys) = 34,带负电荷的氨基酸残基的总个数为 (Asp + Glu) = 29。此外,该蛋白质的不稳定指数为 45.72,相对较高,说明该蛋白不稳定。

应用 DNAMAN 软件对 *SbAGL6* 的氨基酸序列进行同源性比对,结果显示(图 4),其与水稻 (*Oryza sativa*, AY332477)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NM_130127) 和小麦 (*Triticum aestivum*, DQ512329) 的 AGL6 的氨基酸序列同源性依次为 47.1%, 56.81% 和 32.81%,并且比对的蛋白质在 MADS 盒和 K 盒保守,因此, *SbAGL6* 可能是高粱中具有 AGL6 生物功能的同源蛋白。

```
1 atggggaggggacgaggttgagctgaagcggatcgagaacaagatcaaccgccagggtcaccttctccaagcggcgaacggcctgctcaag
M G R G R U E L K R I E N K I N R Q U T F S K R R N G L L K
91 aaggcgtacgagctctccgtgctctgcgacgcgaggtcgctcatcatcttctccagcggcgaagctctacgagttcggcagcgcc
K A Y E L S U L C D A E U A L I I F S S R G K L Y E F G S A
181 ggcataactaaaacactagaaaggtatcaacattgctgctacaacgctcaagattccaatgggtgactctctgaaactcagagctggtac
G I T K T L E R Y Q H C C Y N A Q D S N G A L S E T Q S W Y
271 caggaaatgtcaaaactgaggcgaattgaagccttgacgcgactcagaggaacttgcctggggaggaccttgcccactgagtggtt
Q E M S K L R A K F E A L Q R T I Q R H L L G E D L G P L S U
361 aaggaaatgcagcagctagagaaacagctagaatgtgctttgtcagggcaagacagagaagacacaacttatgatggagcaagtggaa
K E L Q Q L E K Q L E C A L S Q A R Q R K T Q L M M E Q U E
451 gagcttcgcagaaaggcgtcacctgggagaaatgaacaggcaactcaaacacaagcttgaagctgaaggttctagcaactacagaacc
E L R R K E R H L G E M N R Q L K H K L E A E G S S N Y R T
541 ttgcagcatgcccgccgctggccagctcccgccgaccatcggtggagcatgacggcgccacgtatcatgttcatccactgctcactca
L Q H A A A W P A P G G T I U E H D G A T Y H U H P P A H S
631 gttgctatgactgtgaaccactctgcaaatgggtaccctcaccagtttctgccttctgatcagggcagccaataatcccaagg
U A I D C E P T L Q I G Y P H H Q F L P S D Q A A N N I P R
721 aacgccccggaggcgagaacaacttcattgctgggatgggtctcttga 768
N A P G G E N N F M L G W U L *
```

图2 高粱 *SbAGL6* 基因的开放阅读框及导出的编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 2 ORF sequence and encoded amino acids of *SbAGL6* gene in sorghum

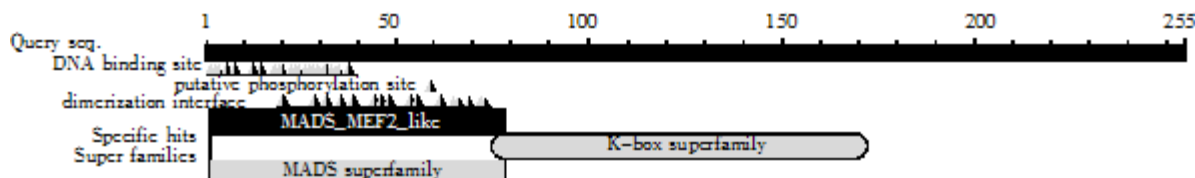


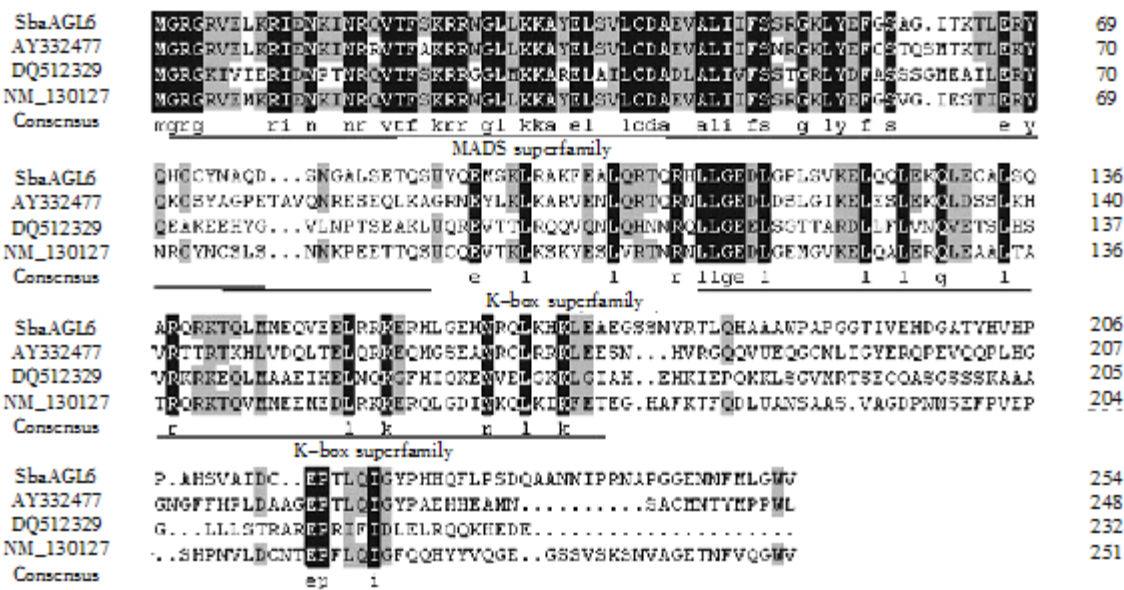
图3 *SbAGL6* 基因氨基酸序列保守域分析

Fig. 3 Domain analysis of *SbAGL6* transcription factor

2.3 *SbAGL6* 转基因拟南芥的表型分析

使用 pKIGW 载体,构建 *SbAGL6* 的可诱导过表达载体,转化获得转基因拟南芥植株。将纯合 T_3 转化株种子和野生型种子同时种植在 1/2MS 培养基

中,14 d 后将幼苗移到加有 Dex 的 1/2MS 培养基中进行诱导处理,发现转入 *SbAGL6* 基因的植株比野生型提前一周开花(图 5)。



序列从上到下依次为高粱 *SbAGL6*、水稻 *AGL6* (AY332477)、小麦 *AGL6* (DQ512329)、拟南芥 *AGL6* (NM_130127)。
The sequences from top to bottom were *Sorghum bicolor* AGL6, *Oryza sativa* AGL6 (AY332477), *Triticum aestivum* AGL6 (DQ512329), *Arabidopsis thaliana* AGL6 (NM_130127).

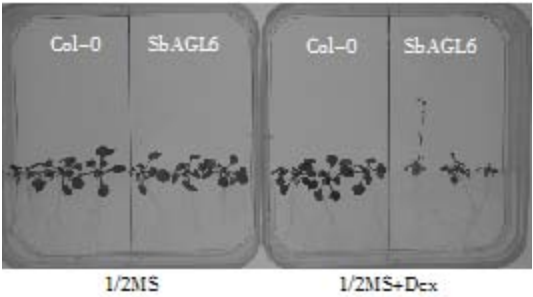
图 4 不同植物来源 AGL6 同源蛋白的氨基酸序列比对分析

Fig. 4 Alignments of predicted peptides of AGL6 protein from different plant species

表 1 编码的各氨基酸在 *SbAGL6* 蛋白中的个数与比例

Tab. 1 The number and percentage of different amino acids in *SbAGL6* protein

氨基酸 Amino acids	数量 Number	百分比 含量/% Percentage	氨基酸 Amino acids	数量 Number	百分比 含量/% Percentage
Ala (A)	21	8.20	Lys (K)	15	5.90
Arg (R)	19	7.50	Met (M)	6	2.40
Asn (N)	12	4.70	Phe (F)	6	2.40
Asp (D)	6	2.40	Pro (P)	10	3.90
Cys (C)	5	2.0	Ser (S)	15	5.90
Gln (Q)	19	7.50	Thr (T)	10	3.90
Glu (E)	23	9.0	Trp (W)	3	1.20
Gly (G)	18	7.10	Tyr (Y)	8	3.10
His (H)	11	4.30	Val (V)	10	3.90
Ile (I)	9	3.50	Pyl (O)	0	0.00
Leu (L)	29	11.4	Sec (U)	0	0.00



Col-0. 野生型拟南芥; *SbAGL6*. 转基因拟南芥;
SbAGL6 + Dex. Dex 诱导的转基因拟南芥。
Col-0. Wild type *Arabidopsis*; *SbAGL6*. Transgenic *Arabidopsis*;
SbAGL6 + Dex. Dex induced transgenic *Arabidopsis*.

图 5 Dex 处理两周龄转基因幼苗后的开花表型

Fig. 5 The flowering phototype of transgenic plants

Dex treatment using two-week-old seedlings

3 讨论

植物经过一定阶段的营养生长期,会在内外因子作用下,进入生殖生长阶段,这一过程受到一系列转录因子的调控,其中包括 MADS 转录因子。为解析高粱花期转换的机制,我们克隆了一个高粱 MADS 转录因子基因 *SbAGL6*,通过生物信息学分析发现,该基因与水稻 (*Oryza sativa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和小麦 (*Triticum aestivum*) 的 AGL6 的氨基酸序列同源性依次为 47.1%、56.81% 和 32.81%,基因属于 MADS-box 基因家族,具有 MADS 盒、K 盒、I 区、C 末端和 N9 末端等典型的结构特征^[14-16]。

关于 AGL6 基因的功能和作用机制,在拟南芥中的研究表明,AGL6 激活 *SOC1*, *SOC1* 又激活 *LFY* 进而促进开花;同时,AGL6 在叶片中也促进了 *SOC1* 和 *LFY* 的转录,导致拟南芥的花期转换^[11]。另有研究表明,矮牵牛的 *FBP2*^[17]、番茄的 *TM5*^[18]、非洲菊的 *GRCD1*^[7] 基因等是 AGL6 的同源基因,也能导致植物提前开花。有些单子叶植物 AGL6 基因的功能也已鉴定, *OSMADS8* 是水稻中的 AGL6 基因,在转基因烟草中过表达能引起提早开花。百合花基因 *LMADS3* 属的 AGL6 基因,在转基因拟南芥中过表达能促使植物提前开花。还有玉米的 *ZMM8* 基因,兰花的 *DOMADS1* 基因都有提前开花的表型。本研究克隆的高粱 *SbAGL6* 基因,若在拟南芥中过量表达,会使转基因植株提前开花,表明 *SbAGL6* 基因与其他物种中的 AGL6 基因的功能相似,也参与了对植

物花期转换的调控。

有些物种 *AGL6* 基因还参与了花器官的发生,过量表达该基因会造成花器官发育异常。在挪威云杉 *DALI*^[5]、文心兰 *OMADS1* 和风信子 *HoAGL6*^[19] 的异位转化拟南芥植株研究中,发现 *AGL6* 类基因能促进开花诱导,引起提早开花和花器官形态或数量的异常^[5-6,9,11,20-21]。然而在百合花中,*AGL6* 类基因 *LMADS4* 过表达只导致开花提前,没有造成花器官发育的异常,这与本研究中 *SbAGL6* 基因过量表达的表型相似。这些研究表明,*AGL6* 基因的生物学功能在不同物种中存在差异,同源基因的功能差异是物种多样性的分子基础,而其产生的原因,可能与物种长期进化有关。

此外,本研究中发现,如果过早进行 Dex 诱导,*SbAGL6* 基因的异位表达会影响植株花期表型的鉴定,而 14 d 时,植物营养器官长到足够大,转基因植株花期表型鉴定结果更加准确,因而,本研究使用的可诱导表达系统能在适当的发育时期诱导植物,避免了组成型表达系统中异位表达外源基因对功能分析的干扰。本研究为进一步解析高粱 *SbAGL6* 基因的功能奠定了基础,同时也为高粱花期性状遗传改良提供了优异基因资源。

参考文献:

- [1] Paenivová L, de Folter S, Kieffer M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-Box transcription factor family in *Arabidopsis*. New openings to the MADS world[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1538 – 1551.
- [2] Alvarez-Buylla E R, Pelaz S, Liljegren S J, *et al.* An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5328 – 5333.
- [3] Purugganan M D, Rounsley S D, Schmidt R J, *et al.* Molecular evolution of flower development: Diversification of the plant MADS-box regulatory gene family[J]. *Genetics*, 1995, 140(1): 345 – 356.
- [4] Theissen G, Saedler H. Floral quartets[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 469 – 471.
- [5] Schomburg F M, Patton D A, Meinke D W, *et al.* FPA, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(6): 1427 – 1436.
- [6] Mouradov A, Glassick T V, Hamdorf B A, *et al.* Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structures of monterey pine[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(1): 55 – 62.
- [7] Tsuchimoto S, Mayama T, van der Krol A, *et al.* The whorl-specific action of a petunia class B floral homeotic gene[J]. *Genes Cells*, 2000, 5(2): 89 – 99.
- [8] Sung S K, An G. Molecular cloning and characterization of a MADS-box cDNA clone of the Fuji apple[J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(4): 484 – 489.
- [9] Mena M, Mandel M A, Lerner D R, *et al.* A characterization of the MADS-box gene family in maize[J]. *Plant J*, 1995, 8(6): 845 – 854.
- [10] Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, *et al.* Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1056 – 1059.
- [11] Hsu H F, Huang C H, Chou L T, *et al.* Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(8): 783 – 794.
- [12] Yang C H, Cheng L J, Sung Z R. Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: the role of EMF genes [J]. *Dev Biol*, 1995, 169(2): 421 – 435.
- [13] Zhang H, van Nocker S. The vernalization independence 4 gene encodes a novel regulator of flowering locus C [J]. *Plant J*, 2002, 31(5): 663 – 667.
- [14] 张玉刚, 韩振海. 小金海棠金属硫蛋白基因 MxMT2 克隆与生物信息学分析[J]. *华北农学报*, 2010, 25(2): 60 – 63.
- [15] Kater M M, Dreni L, Colombo L. Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(13): 3433 – 3444.
- [16] 孙晓茜, 戴洪义, 张玉刚. 柱型苹果 MADS-box 家族的 2 个同源基因克隆与生物信息学分析[J]. *华北农学报*, 2012, 27(2): 50 – 54.
- [17] Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes [J]. *Genes Dev*, 1991, 5(3): 484 – 495.
- [18] Roldán M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, *et al.* Effect of darkness and sugar availability to the apex on morphogenesis and flowering time of *Arabidopsis* [J]. *Flowering Newsl*, 1997, 24: 18 – 24.
- [19] Fan H Y, Hu Y, Tudor M, *et al.* Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins [J]. *Plant J*, 2007, 52(5): 999 – 1010.
- [20] Boss P K, Sensi E, Hua C, *et al.* Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(6): 887 – 895.
- [21] Moon J, Sub S S, Lee R, *et al.* The *SOCl* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellins signals for flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2003, 35(5): 613 – 623.