

# 牡丹 *PsAPI* 基因的表达分析及功能鉴定

张璐,李玉娥,管世铭,刘春英,盖树鹏,张玉喜

(青岛农业大学 生命科学学院,山东省高校植物生物技术重点实验室,山东 青岛 266109)

**摘要:**为进一步探讨 *MADS-box* 基因家族在牡丹花器官发育和开花时间调控中的功能提供理论依据,为培育早花品种提供候选基因。以 RACE 扩增获得 *PsAPI* 基因的全长 cDNA 为基础,分析了其表达模式和功能,以牡丹课题组利用 454 测序得到的类 *API* 基因的部分 cDNA 序列为基础,利用 RACE 扩增方法获得 1 130 bp 牡丹 *PsAPI* 基因全长 cDNA,同源性分析表明,牡丹 *PsAPI* 与葡萄 *VvAPI* 的相似性最高,为 80.4%。实时定量 PCR 分析了其初花期的表达模式,结果表明,*PsAPI* 基因在萼片中转录量最高,其次为花瓣,在雄蕊中表达量最低。将 *PsAPI* 基因在拟南芥中异源表达,分析鉴定了 3 个转基因株系的表型,结果发现异源表达 *PsAPI* 拟南芥开花时间较野生型提前了约 3 d。

**关键词:***PsAPI*;表达分析;异源表达;开花时间

中图分类号:Q78;S685.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0084-06

doi:10.7668/hbnxb.2015.01.014

## Expression Analysis and Functional Identification of *PsAPI* in Tree Peony

ZHANG Lu, LI Yu-e, GUAN Shi-ming, LIU Chun-ying, GAI Shu-peng, ZHANG Yu-xi

(College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology  
in Universities of Shandong Province, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** In this study, based on the full cDNA sequence of *PsAPI*, the expression pattern and function were analyzed in order to offer theoretical basis about the regulatory mechanism during floral organ development and flowering time and provide candidate genes for breeding of early blooming. Based on the partial sequence in tree Peony obtained by 454 high-throughput sequencing, 1 130 bp *PsAPI* full-length cDNA sequence was obtained using RACE amplification. The result of homology analysis indicated that similarity between the *PsAPI* protein and *VvAPI* was highest with 80.4%. We analyzed its expression pattern in seven different tissues at the early stage of flowering by using Real-time quantitative PCR, and the results showed that the expression level of *PsAPI* in sepal was the highest, followed by in petal, the lowest was in stamen. Heterologous expression of the *PsAPI* gene in *Arabidopsis*, and the phenotype of three transgenic lines were identified. The results of phenotypes showed that *PsAPI* gene had accelerated early flowering for about 3 days.

**Key words:** *PsAPI*; Expression analysis; Heterologous expression; Flowering time

营养生长向生殖生长的转变是高等开花植物的重要发育过程<sup>[1]</sup>。近年来,通过对模式植物拟南芥的研究认为,这一过程主要通过 4 条途径控制开花时间,即春化途径、光周期途径、自主途径和赤霉素途径<sup>[2]</sup>。各种途径之间通过 Flowering locus T (FT) 和 Suppressor of overexpression of CO1 (SOC1) 等因子被整合,最终通过 *Apetala1* (*API*), *Agamous* (*AG*) 和 *Leafy* (*LFY*) 等的表达,从而调控从营养生长到生殖生长的转变<sup>[3-5]</sup>。*API* 基因是植物特有的 MIKC<sup>C</sup>-

Type *MADS-box* 基因<sup>[6]</sup>,是 ABC 模型中的 A 类基因,单独调控萼片的发育,和 B 类基因共同调控花瓣的发育。在野生型拟南芥中超表达 *API* 基因,转基因植株开花时间明显早于野生型<sup>[7]</sup>;Weigel 和 Sarah 等<sup>[8-9]</sup>发现,转 *API* 基因型拟南芥在连续光照下 10 d 即可开花,野生型则需要 18 d;吕晋慧等<sup>[10]</sup>将 *API* 基因转入玉人面地被菊,使之提早开花。Chi 等<sup>[11]</sup>从大豆中分离到 *API* 基因,在烟草中异源表达表现出早花现象。迄今为止,对牡丹 *API* 的相关研

收稿日期:2014-11-28

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31101577);国家自然科学基金面上项目(31471908;31372104)

作者简介:张璐(1987-),女,新疆伊宁人,硕士,主要从事牡丹分子生物学研究。张璐、李玉娥为同等贡献作者。

通讯作者:张玉喜(1977-),女,山东聊城人,副教授,博士,主要从事牡丹分子生物学研究。

究未见报道。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.), 芍药科、芍药属的落叶小灌木, 因其丰富的花型、花色被誉为“花中之王”。牡丹产业是山东菏泽和河南洛阳等地的重要支撑产业, 开花时间一般在每年4月中旬到5月上旬, 但花期较短, 影响了其观赏性和经济效益。如何延长花期, 除了花卉生产中根据不同气候、温度、湿度等条件的调节, 转基因技术使开花提前或延后也是行之有效的方法。本课题组 Gai<sup>[12]</sup> 通过 454 测序得到了 15 284 个 unigene, 其中包含类 *API* 基因的部分 EST 序列。本研究在此基础上, 利用 RACE 扩增得到 *PsAPI* 完整 cDNA 序列, 实时定量分析其组织表达特征, 并构建表达载体, 将 *PsAPI* 基因在拟南芥中异源表达, 结果发现 *PsAPI* 基因可以促进开花, 为进一步探讨 *MADS-box* 基因家族在牡丹花器官发育和开花时间调控中的功能提供理论依据, 为培育早花品种提供候选基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

以生长健壮的 4~5 年生牡丹品种鲁荷红(由青岛农业大学植物生理研究室提供)为材料, 取初花期的牡丹各组织(根、茎、叶、萼片、花瓣、雄蕊和心皮), 液氮速冻, 采用原平皓生物公司 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA, -80 °C 保存。

RACE-ready cDNA 第一链合成按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)步骤进行。实时定量 cDNA 第一链的合成按照 TaKa-

Ra 的 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H)试剂盒说明书进行。反转录 cDNA 产物用 EASY dilution(TaKaRa, 大连)10 倍稀释作为实时定量 PCR 分析的模板, 分别设定 3 个生物学重复。

分别取野生型和转基因拟南芥的花提取总 RNA, 方法同上。利用反转录试剂盒中(M-MLV Reverse Transcriptase, TaKaRa)随机引物合成 cDNA 第一链。

### 1.2 RACE 扩增、实时定量 PCR 和 RT-PCR 反应

根据 454 测序得到的 *PsAPI* 的部分 EST 序列设计基因特异性引物进行 RACE 扩增(表 1)。RACE 扩增反应根据 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)步骤进行。

qPCR 反应采用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(TaKaRa)试剂盒进行。利用 Agilent 实时荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行扩增。25 μL PCR 反应体系为 2 × SYBR Premix Dimer Eraser<sup>TM</sup> 12.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.75 μL, 2 μL cDNA 模板和无菌水, 每个样品 3 次技术重复。反应条件为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 45 个循环。设置在延伸收集荧光信号。*Actin* 为内参, 数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[13]</sup>。

RT-PCR 反应程序为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 28 个循环。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭(EB)染色后, 采用 Vilber lourmat 凝胶成像系统的 Bio-1D 软件分析目的基因相对于内参基因(*Actin*)的表达量, *PsAPI*、*AtAGL24* 和 *Actin* 引物序列见表 1。

表 1 引物、序列及退火温度和扩增目的

Tab. 1 Primers, sequences, their annealing temperatures and purposes

引物 Primers	序列 Sequences	退火温度/°C T <sub>m</sub>	扩增目的 Purpose
<i>PsAPI</i> GSP5'	5'-GACAATCAAAGCAACCTCAGCATCAC-3'	65	5'RACE 扩增
<i>PsAPI</i> GSP3'	5'-GCGGAGGGGTGGGTTGCTGAAG-3'	65	3'RACE 扩增
<i>PsAPI</i> ZTF	5'-CTAGTCTAGAATGGGAAGAGGCAGGGTTCAAC-3' <i>Xba</i> I	58	<i>PsAPI</i> 的 ORF 扩增
<i>PsAPI</i> ZTR	5'-GGTACCTCATCATCATGCACCAAAGCACC -3' <i>Kpn</i> I	58	<i>PsAPI</i> 的 ORF 扩增
<i>AtAGL24</i> F	5' - TCCACCTTCTACTCATCTCCG -3'	55	<i>PsAPI</i> 下游基因扩增
<i>AtAGL24</i> R	5' - CTCAGTCTCTTATTCTCATCCACCA -3'	55	<i>PsAPI</i> 下游基因扩增
<i>PsAPI</i> F	5'- CAAGTGACCTTCTCAAAGCGGA -3'	55	<i>PsAPI</i> 实时定量
<i>PsAPI</i> R	5'- AACCAGTTGTCGCTCGGCA -3'	55	<i>PsAPI</i> 实时定量
<i>Actin</i>	5'-GAGAGATTCCGTTGCCCTGA-3'	55	内参
<i>Actin</i>	5'-CTCAGGAGGAGCAACCACC-3'	55	内参

### 1.3 生物信息学分析

测序结果用 DNAMAN6.0 软件进行序列分析和拼接。用 ProtParam 程序([http://expasy.org/cgi-](http://expasy.org/cgi-bin/protparam)

[bin/protparam](http://expasy.org/cgi-bin/protparam))进行蛋白质分子量和等电点等性质的预测。用 Clustal W 软件进行多序列比对, 利用 MEGA 5.2 软件中的邻接法(Neighbor-joining)构建

系统发生树,通过自举分析(Bootstrap)作置信度检验,1 000 次重复检验。

#### 1.4 *PsAPI* 超表达载体的构建

根据 RACE 扩增得到的 *PsAPI* 基因完整编码区设计引物(含酶切位点 *Xba* I 和 *Kpn* I)(表 1)。将扩增得到的产物经测序鉴定无误后,与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株,筛选阳性重组子,提取质粒,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 分别双酶切重组质粒和 pBI121 质粒,由 T4 连接酶(TaKaRa, 大连)连接,构建 *PsAPI*-pBI121 超表达载体。

#### 1.5 转 *PsAPI* 拟南芥的表型分析

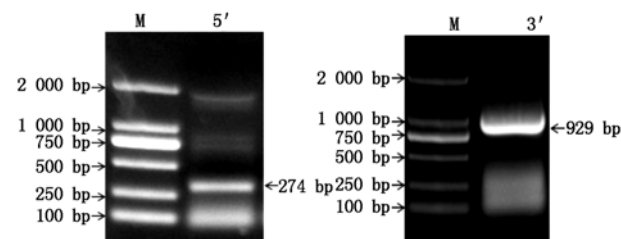
采用蘸花法<sup>[14]</sup>侵染 Columbia 型野生型拟南芥,在含有 50 mg/mL 卡那霉素的 MS 固体培养基上筛选获得转基因 T<sub>2</sub> 纯合体种子。将同时期收获的野生型和转基因种子经过 4 ℃ 处理 3 d 打破休眠,点种于 MS 固体培养基上。把 MS 固体培养基上正常生长 10 d 的幼苗移植营养土(每株系 30 棵),在长日照条件下(22 ℃, 16 h/8 h)培养,统计开花时间和花期。开花时间统计有 2 个指标:从播种到抽

薹 1~2 cm 的时间及此时莲座叶的数目。花期为从初花到最后开花的时间。数据利用 SPSS 进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PsAPI* 基因及编码的氨基酸特征分析

经 RACE 扩增,5'-RACE PCR 产物为 274 bp, 3'-RACE PCR 产物为 929 bp(图 1)。测序后经序列拼接,得到 1 130 bp *PsAPI* 基因全长 cDNA,包括 5'



M. DL2000 Marker; 5'. 5'-RACE 扩增产物; 3'. 3'-RACE 扩增产物。  
M. DL2000 Marker; 5'. 5'-RACE PCR product; 3'. 3'-RACE PCR product.

图 1 *PsAPI* 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis results of *PsAPI* RACE PCR

```
1      ACACAAAAGTAATCAAGAAATGGAACACAGAAGCCGTGTTTCTCTCTGAAGAAAACATTCTCACCCCTTCTCAGAGAATA
85     ACTGATTCGGGAAATTGTCGTGTTGGGTGGTGGGAAAGGAATTACGAGATGGAAGAGGCAGGGTTCAACTGAAGCGTATAGA
                                     M G R G R V Q L K R I E
169    AAACAAGATCAATCGACAAGTGACCTTCTCAAAGCGGAGGGTGGGTGCTGAAGAAAGCTCATGAGATCTCAGTCTTGTGTGA
13     N K I N R Q V T F S K R R G G L L K K A H E I S V L C D
                                     MADS-box
253    TGCTGAGGTGCTTTGATTGCTTCTCTACTAAAGGGAAGCTGTTTGGAGTACTCCACAGATTCTAGCATGGAGAAGATACTCGA
41     A E V A L I V F S T K G K L F E Y S T D S S M E K I L D
337    CCGTTACGAGCGATATTCTATTGCCGAGCGACAACCTGGTTGAGGAACCTGGATCACAGGGAACTGGTCCCTAGAATACTCCAA
69     R Y E R Y S I A E R Q L V E E P G S Q G N W S L E Y S K
421    ACTTAGGGCCAAGATAGAGCTTTTACAAAGAAACCAAGGCGCTTTATGGGAGAAGATCTTGACTCACTGAGTCTCTAAAGATCT
97     L R A K I E L L Q R N Q R R F M G E D L D S L S P K D L
                                     K-box
505    CCAAAATATGGAGCAACAACCTTGACGTTTCTCTTAAAAACATACGATCAAGAAAAATCAACTAATGTATGAGTCAATTTGAGA
125    Q N M E Q Q L D V S L K N I R S R K N Q L M Y E S I S E
589    GCTTCAGAAGAAGGAAAGGCAATCCAGGAGCAAAACAATTGCTAGCAAAGCAGATTAAGGAGAAAGAGAAGACAATGGCACA
153    L Q K K E R A I Q E Q N N L L A K Q I K E K E K T M A Q
673    GCAGGCGCAATGGGAGCAGCAATTCATCATGGCCCAATGCATCAGCCTACCTATTATCACCTCATGAACCTACTACTCTAAA
181    Q A Q W E Q Q I H H G P N A S A Y L L S P H E L T T L N
757    CATGGGTGGCAATTACCAAGGAGAACCACAGAAATGAGGAGGAACGAGCTCGACCTCACCTGGAACCAATATATACGTGTCA
209    M G G N Y Q G E P T E M R R N E L D L T L E P I Y T C H
841    CCTTGGGTGCTTTGGTGCAATCACTGAGGAAAGCACTCCTTCGGACTGTTATGAATTGCTGCTCTCCTTTTGAATTTTGA
237    L G C F G A *
925    GCATTTAATATAGAGTAATATTTATGACTAGTAAGAATCTCTTGAACCTTACTTAAATTACATATAATTTCAAATTTCCAAT
1009   ATTTCAACTACTGAAATAGTCACGACTTCTGTATTCCATGTATAAAAAGTCGAACGATTGCTATGGCAATAAGACCATGT
1093   AGTAGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 用斜体并加粗表示;双下划线标示出 polyA 尾;阴影区域为 *PsAPI* 保守区即功能结构域。

Initiation codon ATG and terminate codon TGA, italic and bold; PolyA tail, double underline; Conservative regions, shaded area.

图 2 *PsAPI* 的全长 cDNA 序列与推测的氨基酸序列

Fig. 2 Full length of cDNA sequence and putative amino acid sequence of *PsAPI*

非编码区 (Untranslated region, UTR) 为 133 bp, 3' UTR 为 268 bp, 含有 30 bp 的 polyA 尾, 完整的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长度为 729 bp, 编码 242 个氨基酸 (GenBank accession No. KJ777535) (图 2)。PsAPI 蛋白分子式为  $C_{1220}H_{1980}N_{360}O_{377}S_{11}$ , 其分子量为 28.075 9 kDa, 理论等电点 pI 为 8.85。利用 Clustal W 软件将 PsAPI 的氨基酸序列与其他已知植物的氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明,

PsAPI 与已知植物的 API 相似性为 65.4% ~ 80.4%, 其中与葡萄的相似性最高, 为 80.4%, 与芒果和甜橙的相似性次之, 分别为 77.5% 和 77%, 相似性最低的是马铃薯, 为 65.4%。利用 MEGA 5.2 软件构建系统进化树 (图 3), 结果表明, PsAPI 先与葡萄 VvAPI 形成分支, 再与芒果、甜橙等木本植物形成分支, 最后与拟南芥、马铃薯等草本植物形成分支, 结果符合进化关系, 与同源性比对结果一致。

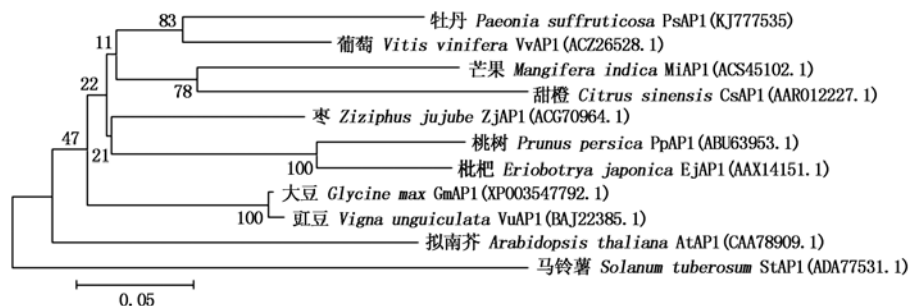


图 3 PsAPI 与其他物种的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Paeonia suffruticosa* PsAPI and the other known proteins

## 2.2 *PsAPI* 基因的组织表达模式

荧光定量 PCR 分析 *PsAPI* 在初花期牡丹的营养器官根、茎、叶及花器官萼片、花瓣、雄蕊和心皮中的表达特性 (图 4), 结果表明, *PsAPI* 基因在牡丹的 7 种不同组织中均有表达, 但表达量不同。其中在萼片中转录水平最高, 其次为花瓣, 在茎、根、叶和心皮中表达量相对较低, 在雄蕊中转录水平最低, 萼片中 *PsAPI* 的表达量约是雄蕊中的 28 倍。

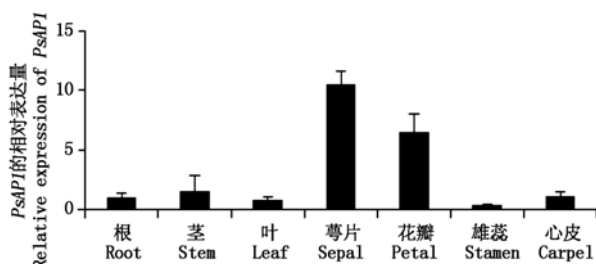


图 4 *PsAPI* 在初花期牡丹不同组织中的表达模式

Fig. 4 The relative expression levels of *PsAPI* in different tissues at the early stage of flowering

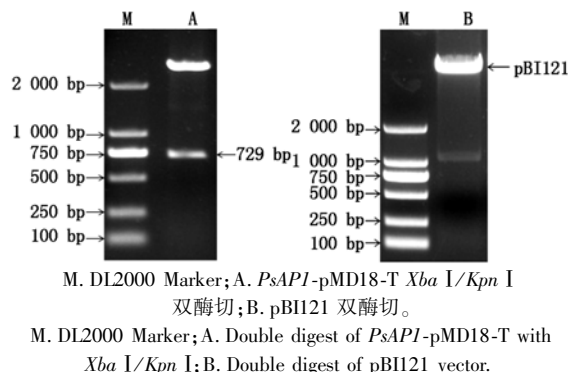
## 2.3 *PsAPI*-pBI121 超表达载体的构建

以牡丹 cDNA 为模板, PCR 扩增得到 *PsAPI* 基因的全长 ORF 区。分别用 *Xba* I 和 *Kpn* I 对 *PsAPI* 基因的全长 ORF 区和 pBI121 质粒 DNA 进行双酶切 (图 5), 回收目的片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下将回收片段连接, 转化大肠杆菌, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆后测序。

## 2.4 *PsAPI* 转基因植株的 PCR 鉴定

将植物表达载体 *PsAPI*-pBI121 转化农杆菌 EHA105, 蘸花法侵染野生型拟南芥, 收获种子, 经 Kan 筛选得到 T<sub>1</sub> 抗性植株, 继续进行 Kan 筛选和

PCR 鉴定, 获得纯合体植株用于表型分析。从 *PsAPI* 转基因 T<sub>3</sub> 植株中选取 3 个株系, 进行 PCR 分子鉴定 (图 6)。结果表明, 3 个株系中外源基因 *PsAPI* 均得到转录, 并且表达量比野生型高。

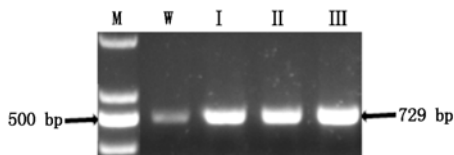


M. DL2000 Marker; A. *PsAPI*-pMD18-T *Xba* I/*Kpn* I 双酶切; B. pBI121 双酶切。

M. DL2000 Marker; A. Double digest of *PsAPI*-pMD18-T with *Xba* I/*Kpn* I; B. Double digest of pBI121 vector.

图 5 *Xba* I/*Kpn* I 双酶切的 *PsAPI* (A) 和 pBI121 载体 (B)

Fig. 5 Double digests of *Xba* I/*Kpn* I of *PsAPI*-pMD18-T and pBI121



M. DNA Marker DL2000; W. 野生型拟南芥; I、II 和 III. 3 个 *PsAPI*-pBI121 转基因拟南芥株系。  
M. DNA Marker DL2000; W. Wild type; I, II and III. Three lines of *PsAPI* transgenic *Arabidopsis*.

图 6 *PsAPI* 转基因拟南芥的 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of *PsAPI* transgenic *Arabidopsis* by PCR

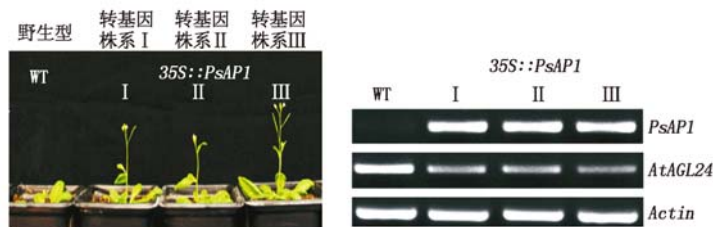
## 2.5 *PsAPI* 异源表达拟南芥开花时间提前

选取在长日照条件下野生型和 T<sub>3</sub> *PsAPI* 转基因拟南芥各 30 株 (3 次重复), 分别统计开花时间和

花期(表2)。结果显示, $T_3$  *PsAPI* 转基因植株较野生型开花时间早且莲座叶数目减少。统计分析表明,野生型拟南芥的平均开花时间为23.2 d,花期为32.4 d,而2个 *PsAPI* 转基因株系的平均开花时间为20.4,19.9 d,花期为29.1,30.5 d,开花时间提前约3 d(图7-A),花期缩短约3 d,莲座叶数目平均

比野生型减少了1~2片。

利用引物 *AtAGL24F* 和 *AtAGL24R* 进行 RT-PCR 扩增,结果表明(图7-B),2个转基因株系下游开花基因 *AtAGL24* 的表达量降低,暗示了 *PsAPI* 基因可能通过抑制下游基因 *AtAGL24* 的表达而促进开花时间提前。



A. *PsAPI* 转基因拟南芥长日照条件下开花提前; B. 下游开花基因 *AtAGL24* 的表达。

A. Transgenic *PsAPI* *Arabidopsis* promote flowering under LD condition; B. The expression of *AtAGL24*, a downstream gene of *API*.

图7 *PsAPI* 异源表达拟南芥开花时间分析

Fig. 7 The flowering time analysis after heterogeneous expression of *PsAPI*

表2 *PsAPI* 基因异源表达拟南芥的表型统计

Tab. 2 *PsAPI* transgenic *Arabidopsis* phenotype statistics

植株 Plant name	莲座叶数目 Rosette leaves number	开花时间 Flowering time	花期 Florescence	植株总数 Plant number
野生型 WT	11.1 $\pm$ 0.26a	23.2 $\pm$ 0.1a	32.4 $\pm$ 0.35a	30
转基因株系 I L I	9.9 $\pm$ 0.39c	20.4 $\pm$ 0.33b	29.1 $\pm$ 0.41c	30
转基因株系 II L II	10.2 $\pm$ 0.37b	19.9 $\pm$ 0.25c	30.5 $\pm$ 0.28b	30
转基因株系 III L III	9.5 $\pm$ 0.49c	20.2 $\pm$ 0.35b	29.5 $\pm$ 0.43c	30

注:a,b,c代表0.05水平下的差异显著。

Note:a,b,c represent significant difference under 0.05.

### 3 讨论

*MADS-box* 基因编码一系列调控植物生长发育的转录因子,其中拟南芥 *API* 基因是典型的 MIKC 型 *MADS-box* 基因,并在花器官发育过程中起着重要作用。迄今为止,人们已从多种植物中分离得到了 *API* 基因并研究了其表达模式,其中包括几种重要的木本植物,如葡萄<sup>[15]</sup>、苹果<sup>[16]</sup>、柑橘<sup>[17]</sup>、梨<sup>[18]</sup>、桃<sup>[19]</sup>、枣树<sup>[20]</sup> 和山定子<sup>[21]</sup> 等。在木兰中分离的 *API* 基因在苞片、雄蕊、心皮及叶片中高度表达<sup>[22]</sup>; 水稻 *API* 的同源基因 *OsMADS18* 在根、叶片、花序及所有的花器官中表达<sup>[23]</sup>; 芒果 *API* 基因在花、果实和幼叶中均有表达,说明芒果 *API* 同源基因不仅参与花器官的发育,而且在果实发育中也起调控作用<sup>[24]</sup>; 日本晚樱 *API* 基因在花芽的萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊中表达,在叶中不表达<sup>[25]</sup>; 桃 *API* 的同源基因 *PpMADS1* 在花萼、花瓣、雄蕊中均有表达<sup>[26]</sup>。这说明不同植物的 *API* 参与调控的生理过程是不同的。本课题组利用高通量测序筛选到 *API* 基因的部分编码区,组织表达分析表明,其在牡丹品种鲁荷红中主要在牡丹的萼片和花瓣中表达,在其他器官

中表达量非常低,这与拟南芥中的表达模式基本一致<sup>[7]</sup>。因此,我们推测牡丹 *PsAPI* 基因在花器官发育过程中起至关重要的作用,也符合 A 类基因的功能特点。

近年来,利用拟南芥为模式植物对高等植物开花时间调控机理的研究取得了长足的进步<sup>[27]</sup>。高等植物的开花过程一般分为2个阶段,一是营养分生组织向花序分生组织转变,二是花序分生组织向花分生组织转变,而参与该过程的重要基因有 *LFY*、*API*、*AGL24*、*CAL*、*TFL1* 等<sup>[28]</sup>,这些基因正调控或负调控花的发育。*API* 基因在花发育过程中扮演中心角色,*AGL24* 通过精确调控 B、C 类基因的表达而阻止花分生组织的早熟,决定花器官适时形成,而 *API* 作为其上游基因在此过程中发挥了重要作用<sup>[29]</sup>。本研究通过转 *PsAPI* 基因拟南芥的表型分析结果发现,转基因株系开花时间早于野生型,并且下游开花基因 *AtAGL24* 在转基因植株中表达水平下降,这可能是因为转基因拟南芥中 *PsAPI* 基因抑制了 *AtAGL24* 的表达使开花时间提前,与拟南芥中的研究结果一致<sup>[7,30]</sup>。本研究为进一步探讨 *MADS-box* 基因家族在调控牡丹花发育以及开花时间过程中的作用

提供理论基础,为创造出更多观赏价值更高的早花品种提供候选基因,未来对 *MADS-box* 基因功能的研究将成为备受关注的领域。

#### 参考文献:

- [1] Komeda Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana* [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 521 – 535.
- [2] Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity [J]. The Plant Cell Online, 2002, 14(suppl 1): S111 – S130.
- [3] Putterill J, Laurie R, Macknight R. It's time to flower: the genetic control of flowering time [J]. BioEssays, 2004, 26(4): 363 – 373.
- [4] Farrona S, Coupland G, Turck F. The impact of chromatin regulation on the floral transition [C]. Seminars in cell & developmental biology, 2008, 19(6): 560 – 573.
- [5] Sablowski R. Flowering and determinacy in Arabidopsis [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(5): 899 – 907.
- [6] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29(3): 464 – 489.
- [7] Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1 [J]. Nature, 1992, 360: 273 – 277.
- [8] Weigel D, Nilsson O. A developmental Switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. Nature, 1995, 377(6549): 495 – 500.
- [9] Sarah J, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, et al. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate [J]. The Plant Cell Online, 1999, 11(6): 1007 – 1018.
- [10] 吕晋慧, 吴月亮, 孙 磊, 等. *API* 基因转化地被菊品种玉人面的研究 [J]. 林业科学, 2007, 43(9): 128 – 132.
- [11] Chi Y J, Huang F, Liu H C, et al. An APETALA1-like gene of soybean regulates flowering time and specifies floral organs [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(18): 2251 – 2259.
- [12] Gai S P, Zhang Y X, Mu P, et al. Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: Assembling, annotation and markers discovering [J]. Gene, 2012, 497(2): 256 – 262.
- [13] 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: 402 – 408.
- [14] Clough S J, Bent A F. Floral Dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735 – 743.
- [15] Calonje M, Cubas P, Martinez-Zapater J M, et al. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine [J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1491 – 1501.
- [16] Kotoda N, Wada M, Komori S, et al. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes LFY and API during flower development in Apple [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125(4): 398 – 403.
- [17] Pillitteri L J, Lovatt C J, Walling L L. Isolation and characterization of LEAFY and APETALA1 homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck 'Washington' [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(6): 846 – 856.
- [18] Liu Y, Kong J, Li T, et al. Isolation and characterization of an APETALA1-like gene from pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(4): 1031 – 1039.
- [19] Li C, Xie H, Zhang L, et al. Molecular characterization of the *PpMADS1* gene from peach [J]. Tree Genetics & Genomes, 2012, 8(4): 831 – 840.
- [20] 孟玉平, 曹秋芬, 孙海峰. 枣树花分生组织特异基因 *ZjAPI* 的克隆与表达分析 [J]. 山西农业科学, 2010, 38(2): 6 – 11.
- [21] 王 娟, 田建保, 杜俊杰, 等. Y 系山定子 *API* 同源基因的克隆及序列分析 [J]. 华北农学报, 2014, 29(5): 66 – 70.
- [22] Kim S, Koh J, Ma H, et al. Sequence and expression studies of A-, B-, and E-class MADS-box homologues in Eupomatia (Eupomatiaceae): Support for the bracteate origin of the calyptra [J]. International Journal of Plant Sciences, 2005, 166(2): 185 – 198.
- [23] Fornara F, Parenicova L, Falasca G, et al. Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the API/SQUA subfamily of MADS box genes [J]. Plant Physiology, 2004, 135(4): 2207 – 2219.
- [24] 罗 聪, 何新华, 陈 虎, 等. 芒果 *API* 同源基因的克隆及其生物信息学分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 851 – 858.
- [25] 刘志雄, 王 莹, 吕小蒙, 等. 日本晚樱花器官特征基因 *CIAP1* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 649 – 654.
- [26] Zhang L, Xu Y, Ma R. Molecular cloning, identification, and chromosomal localization of two *MADS box* genes in peach (*Prunus persica*) [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35: 365 – 372.
- [27] 张素芝, 左建儒. 拟南芥开花时间调控的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 9(3): 301 – 309.
- [28] Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(12): 2013 – 2037.
- [29] Liu C, Xi W Y, Shen L S, et al. Regulation of floral patterning by flowering time genes [J]. Developmental Cell, 2009, 16(5): 711 – 722.
- [30] Gregis V, Sessa A, Dorca-Fornell C, et al. The arabidopsis floral meristem identity genes *API*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes [J]. The Plant Journal, 2009, 60(4): 626 – 637.