

山茶花 *CjAPL1* 基因正义表达载体的构建及对拟南芥的转化分析

孙迎坤^{1,2}, 李纪元^{1,*}, 殷恒福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: 为研究山茶花 *CjAPL1* 基因对于重瓣花形成的作用, 构建了 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 正义植物表达载体, 酶切结果显示, *CjAPL1* 基因正向插入 pCAMBIA1300 的启动子和终止子之间, 表明 *CjAPL1* 植物表达载体构建成功。将 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 采用农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥, 获得转基因阳性植株 65 株。随机挑选表型变异明显的 3 株进行 PCR 扩增都得到了目的条带, Southern 杂交鉴定进一步确认为转基因阳性植株。同时荧光定量检测到在转基因植株中 *CjAPL1* 基因表现出较对照显著提高 6~25 倍的表达量。转基因阳性植株表型变异明显, 花柱和雄蕊数相比野生型各增加 1 枚和 1~4 枚, 萼片边缘发育成白色的瓣化状, 表明在拟南芥中过量表达 *CjAPL1* 基因可以引起花器官形态的变异和数量的变化, 因此该基因在花器官形成和重瓣花发育中具有显著的调控功能。

关键词: 山茶花; *CjAPL1* 基因; 表达载体; 转基因表达

中图分类号: S 685.14

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0789-08

Sense Expression Vector Construction and Analysis of Transgenic *Arabidopsis thaliana* with *CjAPL1* Gene from *Camellia japonica*

SUN Ying-kun^{1,2}, LI Ji-yuan^{1,*}, and YIN Heng-fu¹

(¹Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China; ²College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: In order to investigate the gene function of *CjAPL1*, a homolog of *AP1* from *Camellia japonica*, during double flower formation, pCAMBIA1300-*CjAPL1* sense expression vector was constructed. The restriction enzyme digestion result showed that *CjAPL1* gene was correctly inserted into pCAMBIA1300 sites between 35S promoter and terminator, which indicated that an ectopic expression vector had been successfully constructed. The pCAMBIA1300-*CjAPL1* construct was transformed into *Arabidopsis thaliana* by inflorescence soaking mediated with *Agrobacterium*, and 65 independent transgenic plants were obtained. Three randomly selected positive plants with obvious phenotypic changes were confirmed by PCR amplification and Southern blotting, and high expression levels of *CjAPL1* in transgenic plants were also detected by the Real time-PCR analysis. Compared with WT plants, obvious phenotypic changes including increases of 1 style and 1-4 stamens, sepals edge developed petaloid

收稿日期: 2013-11-28; **修回日期:** 2014-03-04

基金项目: 国家“十二五”科技支撑课题 (2012BAD01B07); 国家国际科技合作计划项目 (2011DFA30490); 浙江省花新品种选育重大科技专项 (2012C12909-6); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (RISF6141)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jiyuan_li@126.com)

morphology with white characteristics, and early flowering, were observed. These results showed that overexpression of *CjAPL1* gene could cause the change of floral organ morphology and number, and therefore indicated that *CjAPL1* could play notable functions during floral organ formation and double flower development.

Key words: *Camellia japonica*; *CjAPL1*; expression vector; transgenic expression

APETALA1 (*AP1*) 基因是 MADS-box 基因家族 A 类亚家族 *AP1/FRUITFULL* (*FUL*)-like 的花器官发育调控基因, 在 *LEAFY* (*LFY*) 等基因的下游表达, 是拟南芥花序分生组织转变为花分生组织过程需要的两个重要基因之一 (Ng & Yanofsky, 2001; Nam et al., 2003)。1992 年 Mandel 等 (1992) 首次从拟南芥中分离到了 *AP1* 基因, 序列分析表明该基因含有 MADS 家族特定的结构域, 其 mRNA 表达水平在早期的花原基中保持一致, 随着花原基的发育高表达逐渐固定在萼片和花瓣部位, 这表明 A 类基因对于萼片和花瓣发育具有重要的调控作用。若 *AP1* 基因发生突变, 会使花分生组织不能正常发育, 从而使一些花变成花序, 并出现萼片和花瓣发育异常的现象 (Bowman et al., 1993)。但在金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中, *AP1* 同源基因 *SQUA* 突变后开花部位发育成了枝条。这些结果表明, *AP1* 基因是一个多基因调控的位点, 基因间通过不同的调控网络来调节 *AP1* 基因在植物体内的表达 (Parey et al., 1998; Wagner et al., 1999)。

目前已有关于山茶花 B 类基因在拟南芥中表达的研究报道, 通过对 *Cjglo1*、*Cjglo2*、*Cjdef* 和 *Cjtm6* 基因对拟南芥的遗传转化及转基因植株花形分析, 研究了山茶花 B 类基因对于花发育的调控作用 (朱高浦, 2011)。山茶花中分离到的 *CjAPL1* 是 *AP1* 的同源基因 (孙迎坤 等, 2013)。本研究中采用拟南芥作为受体植物, 通过山茶花 *CjAPL1* 在拟南芥中的正义表达, 研究该基因对于花器官发育的调控效应, 以期揭示其在山茶花重瓣花发育过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用转基因植物材料为哥伦比亚野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* col-0)。山茶花 *CjAPL1* 基因 (GenBank 登录号 JX657332) 由作者 2011 年克隆 (孙迎坤 等, 2013), 农杆菌 GV3101 和植物表达载体 pCambia-1300 (已经改造, 图 1) 由本实验室制备和保存。

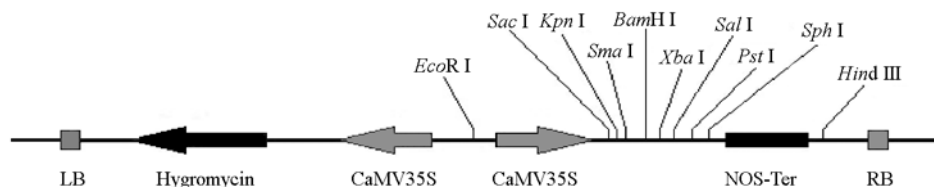


图 1 改造过的 pCambia1300 表达框架结构示意图 (周兴文 等, 2013)

Fig. 1 Structure map of reforming pCambia1300 expressing framework (Zhou et al., 2013)

大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* DH5 α 、pMD[®]18-T 载体、所用限制性核酸内切酶、荧光定量反转录试剂盒和荧光定量反应试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 购自大连 TaKaRa 公司。柱式植物 DNAout 2.0 试剂盒购于北京天恩泽基因有限公司。凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自上海 Axygene 试剂公司。PCR 引物由北京鼎国生物公司合成, 测序由杭州华大基因完成。

1.2 试验方法

1.2.1 山茶花 *CjAPL1* 基因正义表达载体构建

将 *CjAPL1* 基因全长产物 TA 克隆至 pMD[®]18-T 中间载体, 4 °C 连接 12 h 后转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 酶切验证后的重组质粒测序验证正向插入片段。 *Bam*H I 和 *Pst* I 分别双酶切 pMD-*CjAPL1* 重组质粒和 pCAMBIA1300 载体, T4 DNA Ligase 酶连接后, 再次转化 *E. coli* DH5 α 。 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 重组质粒采用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切验证。

1.2.2 农杆菌介导的拟南芥转化

将含有目的基因的 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 重组载体转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 菌液涂布于含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素 (Kan) 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利福平 (Rif) 双抗性的筛选培养基上, 28 °C 黑暗培养 2 d 左右。挑取白色单菌落转化子, 用 *CjAPL1* 基因全长引物 (表 1) PCR 扩增验证。将经双抗性 LB 液体培养的菌液离心, 收集到的菌体重悬于渗透缓冲液 (121 °C 灭菌过的 5% 蔗糖水, SilwetL-77 终浓度为 0.02% ~ 0.03%) 调节 OD₆₀₀ = 0.9 ~ 1.0。将剪除开花花朵及果荚的拟南芥花序部分倒置于渗透缓冲液中浸泡 1 min, 保湿黑暗条件下培养 24 h, 然后置于培养室中进行正常培养。

将春化处理 4 ~ 5 d 的第 1 代转基因拟南芥种子经 70% 的酒精消毒 30 min, 撒播于含有潮霉素 (终浓度 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1/2MS 培养基上进行抗性筛选, 含有目的片段的种子能正常生长。

1.2.3 转基因拟南芥的 PCR 鉴定与荧光定量检测

使用柱式植物 DNAout 2.0 试剂盒提取转基因拟南芥植株 DNA, 以潮霉素基因特异引物和基因全长特异引物 (表 1) 分别扩增, 0.8% ~ 1.0% 琼脂糖凝胶检测转基因植株中目的基因插入情况。采用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒进行转基因植株的杂交鉴定。拟南芥中不存在 *CjAPL1* 基因本身, 与其最同源的基因是 *AP1*, 这两个基因的核苷酸序列存在 67.9% 的相似性, 转基因植株的荧光定量引物设在 *CjAPL1* 和 *AP1* 序列相似性低的区域。荧光定量反转录反应和实时荧光定量 PCR 依照相应试剂盒说明书操作。每个试验和 cDNA 样品各设 3 次重复, 反应在 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 仪器上进行。采用 20 μL 体系, 两步法设置反应程序: 95 °C 40 s; 95 °C 7 s, 60 °C 42 s, 共 40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法。

表 1 山茶 *CjAPL1* 基因鉴定和表达分析所用引物
Table 1 Primers for identification and expression analysis of *C. japonica CjAPL1* gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	用途 Function
P-1	GGAGACCAAGAAAACAAGAGAGAA	全长序列扩增 Full length amplification
P-2	CCTGAAACTTATCCATTGATGTGAC	转基因植株 PCR 验证 Transgene PCR
18S-1	GACTCAACACGGGGAACCTTACC	内参基因扩增 Reference gene amplification
18S-2	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	
Y-1	AAGGAGAAGAAGGAGAAGGAACAG	实时荧光定量 PCR
Y-2	CAAGGAGTGCAATGACTGTGAGATA	Real-time fluorescence quantitative PCR
Hy-1	GCGTCTGCTGTCCATACA	潮霉素扩增验证 Hygromycin amplification
Hy-2	TGACATTGGGGAGTTTAGCG	

2 结果与分析

2.1 pMD-*CjAPL1* 重组载体

将 *CjAPL1* 基因序列 TA 克隆到 pMD[®]18-T 载体中后, 以重组质粒为模板, 以全长引物 P1/P2 进行 PCR 扩增, 将有目的条带的菌液测序验证方向 (图 2), 测序结果与 *CjAPL1* 基因序列 (774 bp)

完全吻合,表明 *CjAPL1* 基因已正向克隆到中间载体 pMD[®]18-T 中。

2.2 山茶花 *CjAPL1* 基因正义表达载体

pMD-*CjAPL1* 正向重组载体中的山茶花 *CjAPL1* 基因与 pCAMBIA1300 载体重组后,重组质粒用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切验证,切下的小片段大小(774 bp)与 *CjAPL1* 基因片段大小相符(图 3),表明 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 植物正义表达载体构建成功。

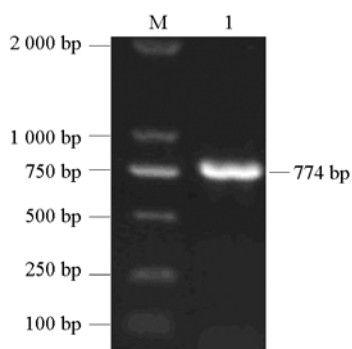


图 2 pMD-*CjAPL1* 重组载体扩增

M: 分子量标准 DL2000; 1: PCR 扩增产物。

Fig. 2 Amplification of pMD-*CjAPL1* recombinant vector construction

M: DNA marker DL2000;

1: PCR product.

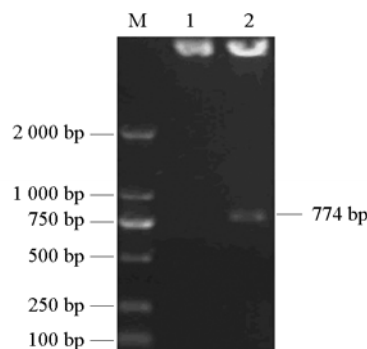


图 3 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 表达载体酶切验证

M: 分子量标准 DL2000; 1: pCAMBIA1300-*CjAPL1* 重组表达载体; 2: pCAMBIA1300-*CjAPL1* 重组载体酶切。

Fig. 3 Enzyme digestion of pCAMBIA1300-*CjAPL1* recombinant expression vector

M: DNA marker DL2000; 1: pCAMBIA1300-*CjAPL1* recombinant expression vector; 2: Enzyme digestion of pCAMBIA1300-*CjAPL1* recombinant vector.

2.3 山茶花 *CjAPL1* 基因正义表达载体转化农杆菌

pCAMBIA1300-*CjAPL1* 重组质粒转化农杆菌 GV3101 后,挑取的白色单菌落以全长引物 P1/P2 进行 PCR 扩增,得到的条带大小与目的基因片段大小一致(图 4),表明 pCAMBIA-1300-*CjAPL1* 正义表达载体已经成功转化到农杆菌 GV3101 中。

2.4 山茶花 *CjAPL1* 基因转化拟南芥的鉴定

利用花序侵染法得到的拟南芥转 *CjAPL1* 基因种子,经潮霉素($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)筛选后,获得第 1 代含 *CjAPL1* 基因抗性植株 65 株。选取表型变化明显的转基因拟南芥植株。提取 DNA 后进行基因全长和潮霉素基因的双重扩增。由图 5 可见,抗性植株中至少有 3 株转基因植株扩增出了目的基因和潮霉素基因的特异性条带,这表明所获得阳性植株为拟南芥转基因植株,可进行表型分析。

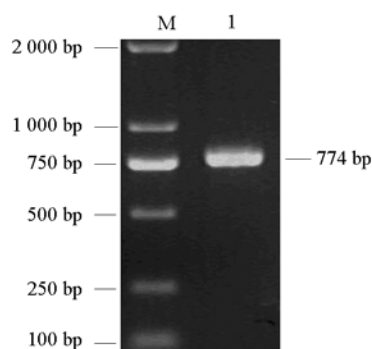


图 4 pCAMBIA1300-*CjAPL1* 表达载体农杆菌转化子的 PCR 鉴定

M: 分子量标准 DL2000; 1: 农杆菌转化子 PCR 产物。

Fig. 4 PCR products of agrobacterium with pCAMBIA1300-*CjAPL1* recombinant vector

M: DL2000 marker; 1: PCR product of *Agrobacterium* transformant.

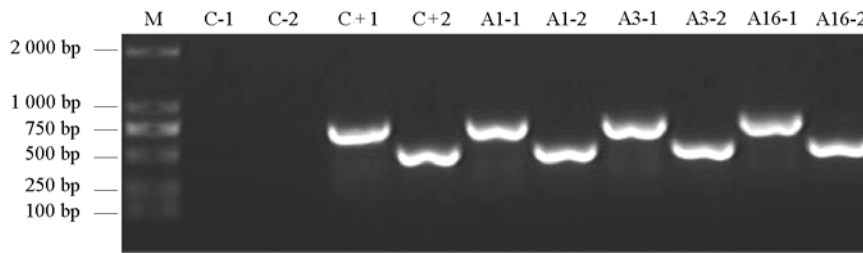


图 5 转 *CjAPL1* 基因的拟南芥 PCR 检测

M: 分子量标准 DL2000; C-1: 阴性对照基因全长引物扩增; C-2: 阴性对照潮霉素引物扩增;
C + 1: 阳性对照基因全长引物扩增; C + 2: 阳性对照潮霉素引物扩增;
A1-1, A3-1, A16-1: 转基因植株全长基因引物扩增;
A1-2, A3-2, A16-2: 转基因植株潮霉素引物扩增。

Fig. 5 PCR amplification of the transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* with *CjAPL1* gene

M: DL2000 marker; C-1: Non-transgenic plant with gene full length primers; C-2: Non-transgenic plant with Hygromycin primers;
C + 1: Positive control with gene full length primers; C + 2: Positive control with Hygromycin primers;
A1-1, A3-1, A16-1: Trans-sense *CjAPL1* plants amplification with gene full length primers;
A1-2, A3-2, A16-2: Trans-sense *CjAPL1* plants amplification with Hygromycin primers.

转山茶花 *CjAPL1* 基因 PCR 鉴定为阳性的植株, Southern 杂交后也都显示单一条带, 而非转基因植株杂交后无条带出现 (图 6), 这再次证实该基因已经成功转入拟南芥基因组中。

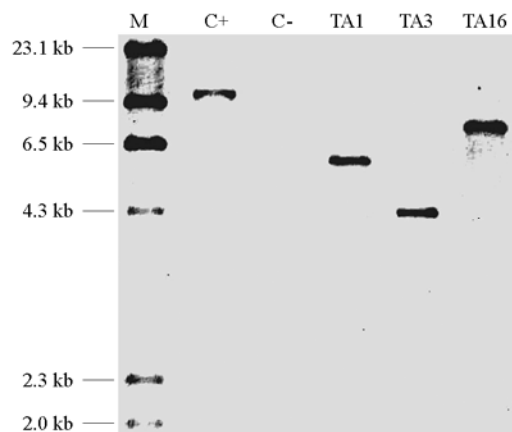


图 6 转 *CjAPL1* 正义基因拟南芥 Southern 检测

M: λ -HindIII 分子量标准; C+: 阳性对照; C-: 阴性植株;
TA1、TA3、TA16: 转 *CjAPL1* 阳性植株。

Fig. 6 Southern detection of transgene *Arabidopsis thaliana* with sense *CjAPL1* gene

M: λ -HindIII digested DNA marker; C+: Positive control of combined vectors; C-: Non-transgenic plants;
TA1, TA3, TA16: Positive trans-sense *CjAPL1* plants.

2.5 转山茶花 *CjAPL1* 基因的拟南芥表型变化

将表型变化明显且经过 PCR 鉴定的转基因拟南芥进行单株收种, 经 2 个世代的连续种植和观察, 获得了稳定的转基因植株。正常的野生型拟南芥花朵由外至内依次包括萼片 4 枚, 花瓣 4 枚, 雄蕊 6 枚和雌蕊 1 枚 (图 7, A), 植株高度 30 ~ 50 cm (图 7, C)。转 *CjAPL1* 正义基因的拟南芥有 29 株花期提前 6 d, 其余提前 7 d; 植株高度显著降低, 仅有 13 ~ 16 mm, 无花序形成, 单花顶生, 仅有 1 ~ 3 片叶 (图 7, D)。全部花器官包括 2 个花柱、7 ~ 10 枚雄蕊 (其中, 转基因植株中 12 株具有 7 枚雄蕊, 25 株具有 8 枚雄蕊, 18 株具有 9 枚雄蕊, 10 株具有 10 枚雄蕊), 萼片和花瓣数量仍

各为 4 枚，但萼片边缘发育成白色质地的花瓣状（图 7，B）。这表明转入的 *CjAPL1* 正义基因在拟南芥中得到表达，引起转基因植物表型发生了明显变化。

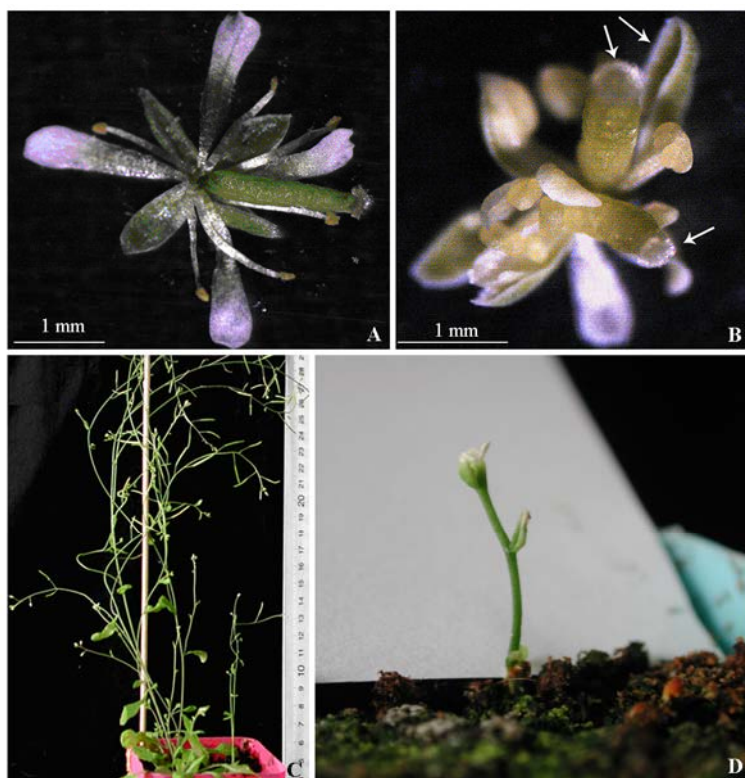


图 7 转山茶花 *CjAPL1* 基因的拟南芥表型变化

A: 野生型拟南芥花; B: 转山茶花 *CjAPL1* 基因拟南芥花; C: 野生型拟南芥植株; D: 转山茶花 *CjAPL1* 基因拟南芥植株。

Fig. 7 Phenotype change of the transgenic *A. thaliana* with sense *CjAPL1* gene

A: Flower of the WT *A. thaliana*; B: Flower of transgenic *A. thaliana* with sense *CjAPL1* gene; C: Plant of WT *A. thaliana*;

D: Plant of transgenic *A. thaliana* with sense *CjAPL1* gene.

2.6 转基因植株的实时荧光定量分析

对于经 PCR 验证的转山茶花 *CjAPL1* 正义基因的拟南芥代表植株 A1、A3 和 A16 进行了荧光定量 PCR 检测，其中 A1 植株花期较野生型提前 7 d，花器官包括 2 个花柱，10 枚雄蕊，萼片和花瓣各为 4 枚，A3 植株花期较野生型提前 6 d，花器官包括 2 个花柱，8 枚雄蕊，萼片和花瓣各为 4 枚，A16 植株花期较野生型提前 7 d，花器官包括 2 个花柱，7 枚雄蕊，萼片和花瓣各为 4 枚。如图 8 所示，转基因植株中 *CjAPL1* 基因的表达量较对照植株有了明显升高，特别是 A1 植株是对照的 25 倍左右，这充分表明 *CjAPL1* 基因转入拟南芥后得到了有效表达。同时，试验结果还表现出花器官数量增多明显的植株（A1）较花器官数量增多较少的植株（A3 和 A16）的表达量显著增高的特点，但在花期提前天数上没有规律的表达特性。

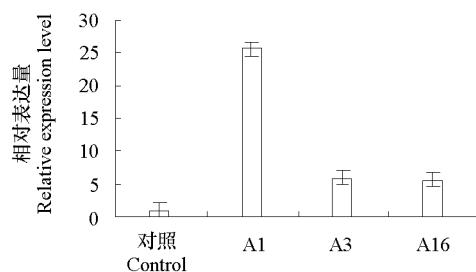


图 8 *CjAPL1* 基因在转基因拟南芥中的表达

Fig. 8 Expression level of *CjAPL1* gene in transgenic *CjAPL1 A. thaliana*

3 讨论

基因的正义表达是研究其基因功能的常用方法,也是最为直观、有效的方法之一。本研究中所采用的 pCAMBIA1300 表达载体和中间载体 pMD[®]18-T 酶切位点一致,同时由于 *EcoR* I 后添加了 CaMV35S 启动子和 *Hind* III 前添加了 T-Nos 终止子,经正向连接到 pMD[®]18-T 载体里的基因序列可以直接双酶切至植物表达载体中,无需再进行方向验证。整个载体构建过程简单,引物不需要添加额外的酶切位点,扩增条件设置方便;载体大小不足 3 kb,方便对植物的遗传转化。载体上的潮霉素基因可以直接用于转化植株的抗性筛选,且通过潮霉素抗性筛选出的抗性苗经 PCR 检测 98% 以上为阳性植株,转化率高。因此,本试验中使用的改造 pCAMBIA1300 植物表达载体在植物转基因遗传转化中具有广泛的应用前景。

目前,已经从多种高等植物中克隆到了与花器官发育相关的 *AP* 同源基因 (Drobyazina & Khavkin, 2006),但在观赏价值极高的山茶花中分离到 *CjAPL1* 基因尚属首次。根据花器官发育的“ABC”模型理论,A 类基因可调控花的第 1 轮萼片和第 2 轮花瓣器官的发育 (Coen & Meyerowitz, 1991; Gregis et al., 2006),本研究中转 *CjAPL1* 正义基因的拟南芥萼片和花瓣数量没有发生变化,但萼片边缘发育成白色质地的花瓣状,这表明该基因对于萼片演变为花瓣的过程具有一定的调控功能,符合花器官发育模型中 A 类基因的功能。同时,转基因植株还出现雄蕊增多的现象,研究还发现,同为 *AP1* 同源基因的 *CjAPL2* 基因的转基因植株也表现出雄蕊增多的现象 (孙迎坤, 2013)。对于山茶 *MADS-box* 家族 *AP1* 基因功能具有从外轮向内轮花器官延展的现象,在其他物种中也有所报道。Kim 等 (2005) 从无油樟属 (*Amborella*)、八角属 (*Illicium*)、木兰属 (*Magnolia*) 等的代表物种中克隆了 *AP1* 同源基因,荧光定量 PCR 和原位杂交结果都显示在上述物种中,*AP1* 同源基因对 4 轮花器官和叶片发育都能够起到调控作用。矮牵牛属 (*Petunia*) 和耧斗菜属 (*Aquilegia*) 中已经克隆到的多个 *AP1/FUL* 同源基因都能够对三轮或四轮花器官发育发挥调控功能 (Litt & Kramer, 2010)。因此,被子植物多个物种中 *AP1* 同源基因的表达都出现了不完全符合花器官发育“ABC”模型的特点,表现出功能上的多样性变化。此外,由于花柱属于雌蕊的组成部分,心皮和萼片是同源异型花器官,所以推测转基因植株花柱增多应为 *CjAPL1* 基因过表达的结果。转基因拟南芥萼片边缘演变为花瓣白色属性的表型,很可能是 *CjAPL1* 基因调控萼片向花瓣演变的过渡状态。转基因植株形改变主要是由于花期提前导致叶片数减少,以及顶端终止花的形成。这两类表型在其他物种中对 *AP1* 家族基因的类似研究也反复出现,其转基因植株主要表现为植株花期提前,花序数量显著减少,茎节间距离缩短等 (Chung et al., 1994; Pelaz et al., 2001; Fernando & Zhang, 2006; 杨郁文 等, 2007),这与转 *CjAPL1* 基因的植株表型相吻合。Kavai-ool 等 (2011) 对于拟南芥 *AP1* 基因不同结构域突变体的研究显示,*ap1-1*、*ap1-3* 和 *ap1-6* 突变体出现花瓣等生殖器官 (花器官) 数量减少的表型,这也证实 *AP1* 在花器官发育中起到了重要的调控作用 (Litt, 2007)。

拟南芥已知的基因组序列为深入研究 *AP1* 基因功能提供了有利条件。研究表明,拟南芥中 *AP1* 基因通过废除靶基因的抑制子而发挥对花器官发育的调控作用,进一步研究显示该基因通过整合生长、激素调控等途径促进花蕾的形成。这表明,尽管本研究证实了 *CjAPL1* 基因对于拟南芥花器官发育具有明显的调控作用,但鉴于植物花器官的发育是多基因和多途径综合调控的结果,*CjAPL1* 基因在山茶花重瓣花形成中的作用机理还需进一步探讨。

References

- Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz E M, Smyth D R. 1993. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting gene. *Development*, 119: 721 - 743.

- Chung Y Y, Finkel D, Yanofsky M F. 1994. Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Molecular Biology*, 26 (2): 657 – 665.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 – 37.
- Drobyazina P E, Khavkin E E. 2006. Homologs of *APETALA1/FRUITFULL* in *Solanum* plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53 (2): 217 – 222.
- Fernando D D, Zhang S. 2006. Constitutive expression of the *SAP1* gene from willow (*Salix discolor*) causes early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Development Genes and Evolution*, 216: 19 – 28.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater M M. 2006. *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (6): 1373 – 1382.
- Kavai-ool U N, Kupriyanova E V, Ezhova T A. 2011. Different influence of mutant alleles of the *APETALA1* gene on the development of reproductive organs in abrupt mutant flowers of the of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Russian Journal of Developmental Biology*, 42 (4): 267 – 271.
- Kim S, Koh J, Yoo M J, Kong H, Hu Y, Ma H, Soltis P S, Soltis D E. 2005. Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: Implications on evolution of floral regulators and the perianth. *The Plant Journal*, 43 (5): 724 – 744.
- Litt A. 2007. An evaluation of A-function: Evidence from the *APETALA1* and *APETALA2* gene lineages. *International Journal of Plant Sciences*, 168 (1): 73 – 91.
- Litt A, Kramer E M. 2010. The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21 (1): 129 – 137.
- Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky M F. 1992. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*, 360: 273 – 277.
- Nam J, dePamphilis C W, Ma H, Nei M. 2003. Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 1435 – 1447.
- Ng M, Yanofsky M F. 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature Reviews Genetics*, 2: 186 – 195.
- Parey F, Nilsson O, Busch M A, Lee I, Weigel D. 1998. A genetic framework for floral patterning. *Nature*, 395: 561 – 566.
- Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohalmi S E, Crosby W L, Yanofsky M F. 2001. Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum*, 112 (1): 95 – 103.
- Sun Ying-kun. 2013. Isolation and function analysis of class A and C genes of MADS-box family from *Camellia japonica* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 孙迎坤. 2013. 山茶花 MADS-box 家族 A 类和 C 类基因克隆及功能分析[博士学位论文]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Sun Ying-kun, Li Ji-yuan, Yin Heng-fu, Fan Zheng-qi, Zhou Xing-wen. 2013. cDNA cloning and expression analysis of *CjAPL1* gene from *Camellia japonica*. *Forest Research*, 26 (4): 473 – 479. (in Chinese)
- 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福, 范正琪, 周兴文. 2013. 重瓣山茶花器官发育相关 A 功能基因 *CjAPL1* 的全长克隆与表达分析. *林业科学研究*, 26 (4): 473 – 479.
- Wagner D, Sablowski R W M, Meyerowitz E M, Meyerowitz E M. 1999. Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science*, 285: 582 – 584.
- Yang Yu-wen, Zhang Bao-long, Ni Wan-chao, Wang Dan, He Xiao-lan, Liu Gui-hua, Yao Shu. 2007. Transformation of floral meristem identity gene *APETALA1* into *Brassica napus*. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 23 (6): 564 – 567. (in Chinese)
- 杨郁文, 张保龙, 倪万潮, 王 丹, 何晓兰, 刘桂华, 姚 姝. 2007. 花分生组织决定基因 *APETALA1* 转化油菜. *江苏农业学报*, 23 (6): 564 – 567.
- Zhou Xing-wen, Li Ji-yuan, Yin Heng-fu, Fan Zheng-qi, Li Xin-lei. 2013. Cloning of *Camellia nitidissima* flavonol synthase cDNA and construction of sense, RNA interference expression vectors. *Bulletin of Botanical Research*, 33 (1): 58 – 65. (in Chinese)
- 周兴文, 李纪元, 殷恒福, 范正琪, 李辛雷. 2013. 金花茶 *FLS* 基因的克隆及其表达载体的构建. *植物研究*, 33 (1): 58 – 65.
- Zhu Gao-pu. 2011. Isolation of B-function MADS-box genes in *Camellia japonica* and its potential role in double flower formation [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 朱高浦. 2011. 山茶花 MADS-box 家族 B 类基因克隆及其在重瓣花形成中的作用[博士学位论文]. 北京: 中国林业科学研究院.