

托桂型茶花‘金盘荔枝’中花器官发育 基因 *CjAG1* 的克隆与功能分析

孙迎坤^{1,2}, 李纪元^{1*}, 殷恒福¹, 范正琪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 为探讨山茶重瓣花形成的机理, 在山茶 A 和 B 类基因研究的基础上, 通过同源基因查找分析, 从山茶 (*Camellia japonica*) 重瓣品种‘金盘荔枝’ (‘Jinpan Lizhi’) 早期花芽中克隆了长度为 1 418 bp 的 C 类基因 *CjAG1* 全长 cDNA 序列 (Genbank 登录号 JX843816), 包括长度为 224 bp 的 5' 非编码区、768 bp 的编码区和 426 bp 的 3' 非编码区三部分。基因编码的蛋白质包含 258 个氨基酸残基, 属于不稳定亲水性蛋白, α -螺旋和无规则卷曲构成了其结构骨架。Real-time PCR 检测结果显示, *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’内轮花器官雄蕊和心皮的相对表达量高于外轮花器官萼片和花瓣, 最高表达量是在花柱部位, 子房、雄蕊、瓣化雄蕊和瓣化萼片的表达量居中。转拟南芥 *ag-1* 突变体后, 阳性植株雄蕊数量恢复为 6 枚, 证实了 *CjAG1* 基因具有调控雄蕊数量增加的功能。说明 *CjAG1* 基因可能对于‘金盘荔枝’重瓣花形成具有重要的调控作用。

关键词 茶花; ‘金盘荔枝’; *CjAG1* 基因; 克隆; 功能分析

中图分类号 S685.14

文献标识码 A

Cloning and Function Analysis of *CjAG1* Gene from *Camellia japonica* Cultivar ‘Jinpan Lizhi’

SUN Yingkun^{1,2}, LI Jiyuan¹, YIN Hengfu¹, FAN Zhengqi¹

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

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

Abstract In order to discuss the mechanism of double flower formation, a 1418 bp full-length cDNA of *CjAG1* gene (JX843816) was cloned from the early flower bud of *Camellia japonica* ‘Jinpan Lizhi’ by the homologous gene analysis after class A and B genes were studied, which consisting of 5'-Untranslated region (UTR) of 224 bp, coding region of 768 bp and 3'-UTR of 426 bp. The instable and hydrophilic protein encoded by *CjAG1* gene contained 258 amino acids, and alpha-helix and random coil were the main construction. The results of Real-time PCR showed that the expression level of *CjAG1* was higher in inside floral organs (stamen and carpel) than in outside ones (sepal and petal). The highest level was present at style, and the middle one was present at ovary, stamen, petalody stamen and petalody sepal. The stamen of *ag-1 Arabidopsis thaliana* with transgenic *CjAG1* gene reverted to 6, which indicated *CjAG1* gene could add the quantity of stamen. The results indicated *CjAG1* gene may have important regulation function in the process of ‘Jinpan Lizhi’ double flower forming.

Key words *Camellia japonica*; ‘Jinpan Lizhi’; *CjAG1* gene; Cloning; Function analysis

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2013.09.013

典型双子叶植物的花器官包括四轮结构, 由外至内依次为萼片、花瓣、雄蕊和心皮。自然界中存在各种各样的花型, 特别是重瓣类型的花朵, 是花器官在形成过程中受到外部环境和内部基因的双重调控结果^[1-2]。随着分子生物学技术手段的推广利用, 分子育种成为现代植物育种的重要方式。双子叶植物花器官发育受到含有 MADS-domain 结构域的多个基因调控。早在 20 世纪初, 根据分离到的花发育基因在模式植物中的功能, Coen 等^[3]提出了

调控花器官发育的“ABC 模型”, 到 21 世纪初发展为较完善的“ABCDE”模型^[4-5]。根据此模型, 萼片发育由 A 类基因单独调控, 花瓣发育为 A 类与 B 类基因共同调控, 雄蕊发育由 B 类和 C 类基因共同调控, 且 C 类基因还能够单独调控心皮发育, 胚珠发育为 D 类基因调控, E 类基因可参与调控萼片、花瓣、雄蕊和心皮四轮花器官发育。本试验所研究的 *AGAMOUS (AG)* 基因是 MADS-box 基因家族调控雄蕊和心皮发育的 C 类重要基因。

收稿日期 2013-04-08

修回日期 2013-08-01

基金项目 国家国际科技合作计划项目 (No. 2011DFA30490); 国家十二五科技支撑课题 (No. 2012BAD01B07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (No. RISF6141)。

作者简介 孙迎坤 (1977 年—), 女, 博士研究生, 讲师; 研究方向: 观赏植物分子育种和园林设计。*通讯作者: 李纪元, E-mail: jiyuan_li@126.com。

AG 基因通过调控雄蕊和雌蕊器官性质在拟南芥花发育过程中起到重要作用。1995 年, Kang 等^[6]从水稻中分离到了 *OsMADS3* 基因, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)AG 基因有 62% 的同源性, 原位定位研究显示, 该基因主要在雄蕊和心皮中起到调控作用。目前已有研究者从多个物种中分离到了 AG 基因并对其功能进行了研究, 如半定量 PCR 结果显示, 日本晚樱(*Prunus lannesiana*)的 *PrseAG* 局限于单瓣品种的雄蕊和心皮中表达, 但在重瓣品种的萼片、雄蕊和心皮中高表达, 转拟南芥植株出现花期提前、雄蕊和心皮数量增多及萼片转变为雄蕊状器官的表型; 悬铃木(*Platanus acerifolia*)中 *PlacAG* 基因的荧光定量分析结果表明, AG 基因的表达具有物种特异性^[7-8]。山茶(*Camellia japonica*)品种具有丰富的花型变异, 野生种也存在萼片和雄蕊瓣化的现象, 是研究花器官发育的理想材料, 但目前尚未有关于山茶中 AG 基因的研究报道。本课题组前期已经从山茶托桂型重瓣山茶品种‘金盘荔枝’(*C. japonica* ‘Jinpan Lizhi’)中同源克隆到了 MADS-box 家族中 A 类的 3 个基因, 从完全重瓣型品种‘红十八学士’(*C. japonica* ‘Hongshiba Xueshi’)中克隆到了 B 类的 4 个基因, 发现 A 类的 *CjAPL1*、*CjAPL2* 和 *CjAGL6* 及 B 类的 *DEF* 基因都具有调控花瓣数量增加的功能, 这在重瓣花形成中具有重要意义。雌雄蕊起源在山茶重瓣花发育中普遍存在, 因此根据花器官发育的“ABC 模型”, 对雌雄蕊发育具有调控作用的 AG 基因可能会在山茶重瓣花形成中具有重要作用。鉴于此, 本文选取涵盖全部花器官类型的‘金盘荔枝’进行 AG 基因的克隆和表达分析, 以探讨其在重瓣花发育中所发挥的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

山茶花品种‘金盘荔枝’栽植于中国林科院亚林所院内, 2011 年 11~12 月采集早期发育状态的花芽 3 个(直径 ≤ 3 mm); 2011 年 1~3 月采集初放期的花朵, 立即分离内外轮花瓣上部和基部、雄蕊上部花丝和下部融合部分、萼片、瓣化萼片、瓣化雄蕊、雌蕊的花柱和子房等各部分花器官, 每个样品取 3 个重复。拟南芥 *ag-1* 突变体购自拟南芥网站。

柱式植物 RNAout 2.0 试剂盒和 DNA 清除剂 V1.1 皆购于天恩泽基因公司, RACE 试剂盒购于 Clontech 公司, cDNA 第一链反转录试剂盒和 T4 DNA 连接酶皆购自 Fermentas 公司。DH5 α 、所用酶类、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 购于 TAKARA

公司。农杆菌 GV3101 和经改造的植物表达载体 pCambia-1300 由本实验室保存。质粒微量提取和凝胶回收试剂盒购于爱思进公司, 引物由上海生物工程服务有限公司合成, 测序由杭州华大基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 ‘金盘荔枝’ *CjAG1* 基因 cDNA 全长扩增

通过查找 GenBank 中 AG 同源基因的序列信息, 设计‘金盘荔枝’中 AG 基因的保守区 P-1F(5'-CACCGGATCGGTGGCAGAAATTAATGC-3')和 P-1R(5'-GGATCGGATTCCGGTAATACTTCTCTC-3')。液氮研磨法提取所采集的‘金盘荔枝’花芽 RNA, 并依照反转录操作手册合成 cDNA, 进行同源片断扩增, 产物进行琼脂糖凝胶电泳(0.9%)检测, 获得的目的条带送公司测序, 测序结果经比对分析后得到‘金盘荔枝’中 AG 基因的保守区部分序列。根据 Clontech 试剂盒指导设计 3' RACE 扩增特异引物 GSP1(5'-GATGAACCTGATGCCTGGAGGGGGG-3')和 5'引物 GSP2(5'-TATTCAGACCCCCCTCCAGGCATCA-3'), 分别获得‘金盘荔枝’中 AG 基因的 3'和 5'末端序列, 测序验证后, 根据保守区部分序列、3'和 5'末端序列进行基因电子全长拼接, 分析验证得到全长 cDNA。再以全长引物 P-2F(5'-GTACAGAAGAAAGAGGGACAAGC-3')和 P-2R(5'-CATCTCCATTTACGGAACGAAC-3')对‘金盘荔枝’花芽 cDNA 进行扩增, 得到全长片断, 再次测序予以验证。

1.2.2 ‘金盘荔枝’ *CjAG1* 基因编码蛋白质的生物信息学分析 利用 NCBI 网站在线进行 *CjAG1* 基因的开放阅读框(ORF)查找、同源序列比对分析等; 利用 Prot Param 软件进行 *CjAG1* 基因保守区所编码蛋白质的相对分子量、氨基酸种类及组成数目、理论等电点、蛋白质稳定性等生物信息学特性分析; 利用 Prot Scale 和 HNN 等软件分析蛋白质的 α -螺旋、 β -转角等二级结构; 同源建模系统(<http://cn.expasy.org>)推导蛋白质的三级结构。利用 AlignX 软件进行基因序列的拼接, 利用 DNAMAN 软件构建基于 AG 的山茶系统发育树。

1.2.3 *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’花器官中的空间表达 根据克隆得到 *CjAG1* 基因序列, 设计实时荧光定量引物 Y-F(5'-AAAACACAACCAATCGGCAAGTCAC-3')和 Y-R(5'-GGCAACCTCAGCATCACA TAGAACA-3')。提取‘金盘荔枝’萼片、花瓣等各部分的总 RNA, 分别反转录为 cDNA。以山茶 18S rRNA(基因登录号为 U42815.1)作为内参, 设计内

参荧光定量引物 S-F(5'-GACTCAACACGGGAAA CTTACC-3')和 S-R(5'-CAGACAAATCGCTCCACCA AC-3')。荧光定量反应体系 20 μ L。反应程序：95 $^{\circ}$ C 7 s；60 $^{\circ}$ C 42 s，40 个循环，增加熔解曲线反应。每个实验和样品进行 3 次平行反应，利用随机配套软件和 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行测定数据整理分析。

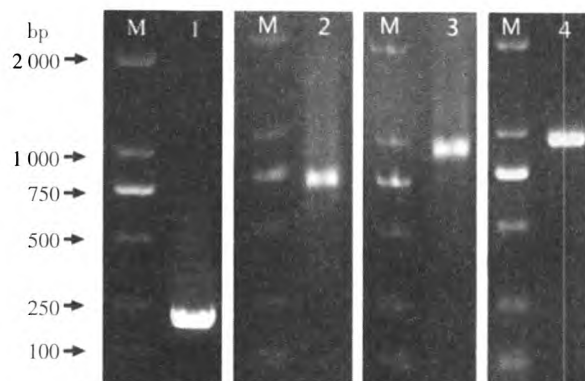
1.2.4 *CjAG1* 基因转化拟南芥 *ag-1* 突变体 参考周兴文等^[9]植物正义表达载体的构建方法，将 *CjAG1* 基因连入启动子为 *CaMV35s* 的植物表达载体 pCAMBIA1300 中，构建正义植物表达载体，命名为 pCAMBIA1300-*CjAG1*；参考朱高浦等^[10]的方法，将 pCAMBIA1300-*CjAG1* 转化农杆菌 GV3101，并采用花序浸泡法转化拟南芥 *ag-1* 突变体。

2 结果与分析

2.1 ‘金盘荔枝’ *CjAG1* 基因 cDNA 序列及分析

以‘金盘荔枝’花芽 cDNA 为模板、保守区引物 P-1F/P-1R 所扩增的同源片段，转化感受态细胞 *E. Coli* DH5 α 后，挑取单菌落送去测序，获得 189 bp 的同源目的片段(图 1)。GSP1 引物扩增得到的 3'末端序列长度为 703 bp，GSP2 引物扩增的 5'末端序列为 892 bp。将得到的 3 段序列拼接后得

到全长为 1 418 bp 的 *CjAG1* 基因序列(Genbank 登录号 JX843816)。全长引物扩增得到 917 bp 的序列片段，测序结果与电子全长序列一致。



M. 分子量标准 DL 2 000；1. 基因同源片段；2. 3'RCAE 扩增片段；3. 5'RACE 扩增片段；4. 基因全长扩增片段。

图 1 ‘金盘荔枝’ *CjAG1* 基因扩增电泳结果

ORF Finder 软件分析结果表明，*CjAG1* 基因由 3 部分组成，分别为：224 bp 的 5'非编码区、768 bp 的编码区和 426 bp 的 3'非编码区，编码区的终止密码子为 TAA，整个序列中含有 Poly(A)结构。这表明所获得的 *CjAG1* 基因序列完整，为基因功能的分析奠定了基础(图 2)。

```

1  ACATGGGAC GTATAATTGA GCGCAAGAC GAGATTGATG AGCTTGTGTTA CTTTATAAAT TCTTAAATAC CCACTCTCTG CTGCAACTCT CTTCATTCT CTCTCTGTCT
111 CTCTCTCTCA AGTTGAGGTT TGTACAAAG AAAGAGGGAA AAGCAAAGGG AGAAACATTA GTTTTATCTC CTTAATTGTC TTCTCTTTTC TTGCATCAT ACCAGCTTGC
221 AACCAATGTC TATCTGAATC AATCGATGGA GGTCTTGGAC TCTCCCGAGA GAAAAATAGG TAGGGGAAAG ATCGAGATCA AGCCGATCGA AAACACTACG AATCGCCAAG
331 TCACCTTCTG CAAGCGTCGA AACGGCTTGC TCAAGAAAGC CTATGAATTG TCTGTTCTTT GCGATGCCGA GGTGCGCCTA ATCGTCTTCT CCACCCGCGG CCGCCTTTAC
441 GAGTACTCCA ACAACAGTGT CAAGGCTACA ATTGAAAGGT ACAAGAAGGC ATGCTCAGAC TCGTCCAATA CTGGATCGGT TTCTGAACCT AATGCTCAGT TCTATCAGCA
551 AGAAGCAGCA AAATTACGTG GCGAAATTTT GAAATTGCAG AATTACACACA GGCAAATGTT GGGTGAGTCT CTGAGCTCTA TGTCTATTAG GGAATCTAAG AACCTCGAGA
661 GTGCTCTAGA GAGAGGCAAT AGCAGGATTC GATCCAAAA GAATGAGCTC TTAATTGCTG AAATCGAACT TATGCAACAA AGGGAAATCG ACTTGCATAA TAGTAACCAA
771 TACCTCCGAG CAAGATAGC TGAGAAATGA AGAGCTCAGC AGCAGATGAA CTTGATGCTT GGAGGGGGGT CTGAATATGA GCTGATGCCA TCTCAGTCAI TTGATGCTCG
881 CAATTACCTT CAAATGAATG GCAITCAACA ACAGCAACCA CAACAACAAC AACACACACC CAATCATCAT CACTACTCTC GCCATGACCA AACAGCCCTC CAGCTAGTTT
991 AATTTCCTTG AAGGCTGCTA GTTTTCTGCT GTTGTTCCTG TAAATGGAGA TGTAGTATTT TAGCAGATGA AGCTCCAGCT ATCTTTGGGA AATGCTATGA ACTGGAGGTT
1101 CAAITGCTGA AGCCTTTTAT ACTCAGATA AATGGTTGCT TCAITGATGC TATTGTCTAT TCTGTGTGTA AAAAAAGAGT TTAATTGCTT TTGTGGTTGA TGTITGCACT
1211 GTGATATTAT GATGTTAGGT ACTATTGTAA TCCCTCCCTA TCTTTTGTGT GATTTCCTTG GATCTCTGTT ACATAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGTACTC
1321 TGGCTTGATA CCACTGCTTA ATCGAATTC CCGGCCGCC ATGGGGGCCG GGAGCATGCG ACGTCGGGCC CAATTCGCCC TATAGTGAGT CGTATTAC
    
```

第 3 行包括起始密码子，第 9 和 10 行点线处为终止密码子，第 12 行显示 Poly(A)结构。

图 2 *CjAG1* 基因 cDNA 核苷酸序列分析

2.2 *CjAG1* 基因编码的蛋白质特性

ProtParam 软件在线分析结果显示，*CjAG1* 基因编码 1 条含有 258 个氨基酸的蛋白质，分子量为 29 943.9 ku，原子总数 4 178，分子式为 $C_{1281}H_{2082}N_{404}O_{397}S_{14}$ ，理论等电点(PI)为 9.67，平均亲水指数(GRAVY)为-0.923，不稳定系数为 64.29，分析确定 *CjAG1* 基因所编码的蛋白为亲水性不稳定蛋白。

蛋白质二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲结构为主，分别为 46.90% 和 44.19%；延伸链仅占 8.91%；整个空间结构中不存在 β -转角等其他区

域(图 3)，朱高浦等^[10]对于山茶 B 功能基因编码蛋白质的结构预测也有类似结果。



图 3 预测的 *CjAG1* 蛋白三级结构

2.3 ‘金盘荔枝’ *CjAG1* 基因编码蛋白的同源性分析

采用 DNAMAN 6.0 软件对山茶花及查找到的具有代表性的近缘木本植物重瓣和单瓣物种的 AG 蛋白序列比对分析。结果显示,‘金盘荔枝’ *CjAG1* 蛋白与供比对物种的 AG 蛋白序列具有 78% 以上的同源性(图 4)。其中, *CjAG1* 蛋白与八仙花(*Hydrangea macrophylla*) AG 蛋白的同源性最高,其次为半边莲(*Lobelia erinus*)、葡萄(*Vitis amurensis*)等。八仙花和‘金盘荔枝’同为重瓣花型物种,高同源性的 AG 蛋白序列表明,这 2 个物种的 AG 基因很可能在花器官发育过程中发挥了与重瓣花发育相关的调控作用,这为进一步研究 *CjAG1* 基因功能提供参考依据。

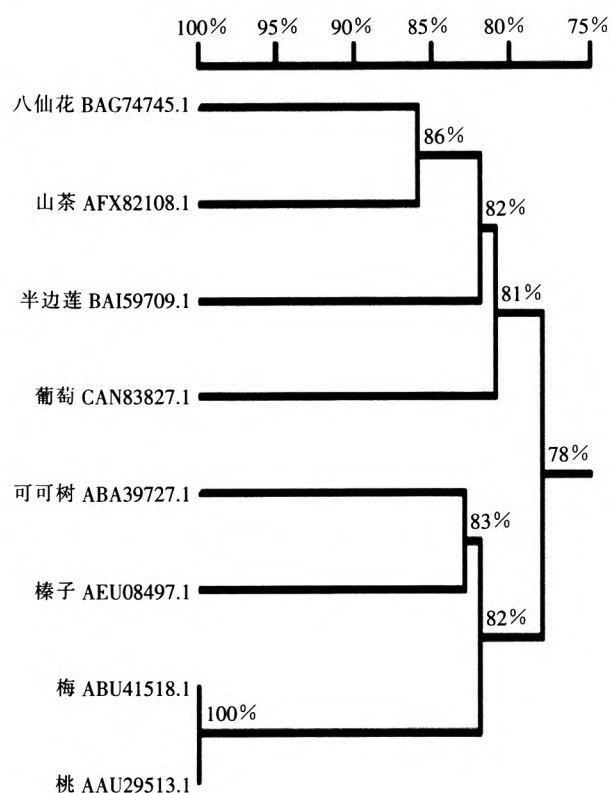
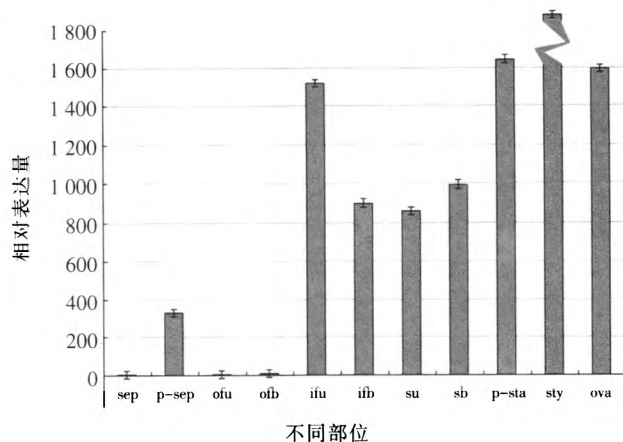


图 4 山茶 *CjAG1* 蛋白与其它物种 AG 蛋白同源性分析

2.4 *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’花器官中的表达

以 18S rRNA 作内参的实时荧光定量(Real-time PCR)检测结果显示, *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’内轮花器官的相对表达量很高,且总体上高于外轮花器官(图 5)。最高表达量是在花柱部位,达到萼片中的 10 000 倍;子房、雄蕊及内轮花瓣中的表达量居中,但也明显高于外轮花瓣和萼片中的表达量;外轮花器官中, *CjAG1* 基因在瓣化萼片的表达量又为最高。这表明 *CjAG1* 基因对于‘金盘荔枝’雄蕊和雌蕊发育具有很强的调控作用。

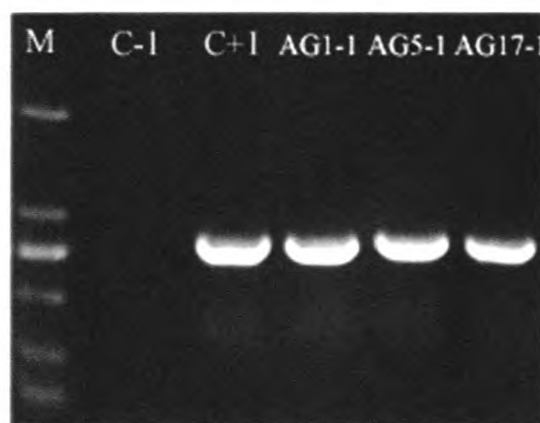


sep. 萼片; p-sep. 瓣化萼片; ofu. 外轮花瓣上部; ofb. 外轮花瓣下部; ifu. 内轮花瓣上部; ifb. 内轮花瓣下部; su. 雄蕊上部; sb. 雄蕊下部; p-sta. 瓣化雄蕊; sty. 花柱; ova. 子房。

图 5 *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’花器官不同部位的相对表达量

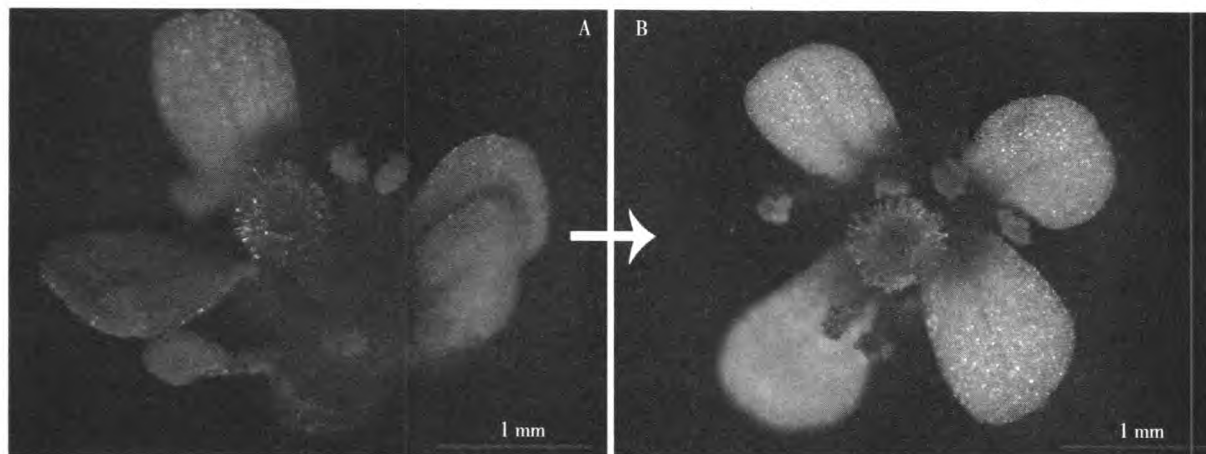
2.5 *CjAG1* 基因转化拟南芥 *ag-1* 突变体

用于遗传转化的拟南芥 *ag-1* 突变体花器官表型为萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊数量分别为 4、4、5 和 1。利用花序侵染法获得的转基因植株种子,在 1/2MS 培养基上经潮霉素(20 mg/L)筛选后,共获得阳性植株 28 株。随机选取 3 株阳性植株提取 DNA 进行基因全长扩增(图 6),植株皆能够扩增出目的基因全长条带,由此判断 *CjAG1* 基因已经转入突变体拟南芥基因组中。在获得的 28 株转基因植株中,有 25 株的雄蕊数量恢复为野生型的 6 枚(图 7)。转 *ag-1* 突变体拟南芥的雄蕊数量增加的现象表明, *CjAG1* 基因可以调控雄蕊的发育,有增加雄蕊数量的功能,雄蕊数量的增加是重瓣花雄蕊起源的前提条件,因此该基因可能对于重瓣花的形成具有调控作用^[11]。



M. 分子量标准 DL 2 000; C-1. 阴性对照基因全长引物扩增; C+1. 阳性对照基因全长引物扩增; AG1-1, AG5-1, AG17-1 为转 *CjAG1* 基因阳性植株基因全长引物扩增。

图 6 *CjAG1* 基因转化拟南芥 *ag-1* 突变体 PCR 检测



A. 拟南芥 *ag-1* 突变体; B. 转 *CjAG1* 基因的拟南芥 *ag-1* 突变体。

图7 *CjAG1* 基因转化拟南芥 *ag-1* 突变体花型

3 讨论与结论

本研究从‘金盘荔枝’花芽中克隆了与花器官发育相关的 *CjAG1* 基因,序列全长为 1 418 bp,结构完整。生物信息学分析表明,该基因属于典型的 MADS-box 基因家族,所编码的蛋白质结构以 α -螺旋和无规则卷曲结构为主,山茶 *CjAG1* 蛋白与八仙花、半边莲和葡萄等具有高度同源性。

Real-time PCR 对 *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’不同花器官中的表达量检测结果中,花柱和雄蕊部位出现的高表达现象在其他物种 *AG* 同源基因的表达模式中也存在。Wang 等^[12]利用半定量 PCR 和实时定量 PCR 方法检测玉簪(*Hosta plantaginea*)中的 *AG* 同源基因 *HpAG* 的表达,结果表明, *HpAG* 在玉簪的雌蕊和雄蕊中存在特异表达现象。蕙兰(*Cymbidium faberi*)中 *CfAG* 基因在子房、蕊柱和花芽中的特异表达结果也证实了 *AG* 基因对于内轮花器官的调控作用^[13]。观赏植物梅(*Prunus mume*)中 *AG* 基因的空间表达结果表明, *AG* 基因主要在梅的雌蕊、雄蕊、萼片和果皮等生殖器官中进行特异性高表达,在叶片和花瓣中没有检测到明显的表达量^[14]。另有研究结果表明, *AG* 基因除在花器官中的空间表达中具有调控作用外,在花器官不同发育阶段的表达量也不同。模式植物拟南芥中 *AG* 基因可以在萼片原基、心皮和雄蕊原基的分生组织、心皮和雄蕊原基、心皮和雄蕊中依次进行高表达,表明花器官的同源异型发育特性和 *AG* 基因调控的关系^[15]。吕山花^[16]对太行花(*Taihangia rupestris*)中的 *TrAG* 基因表达模式研究也表明, *AG* 基因对于花器官的调控具有时间特性。

结合转基因研究结果可知,‘金盘荔枝’中获得的 *CjAG1* 基因对于雌蕊和雄蕊的表达调控具有

功能保守性,符合花器官发育模型理论中 C 类基因的功能特点。此外, *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’的瓣化雄蕊和内轮花瓣中也存在高表达现象。由形态观察可知,瓣化雄蕊是雄蕊和花瓣之间的一种过渡性花器官,荧光定量所检测的瓣化雄蕊和内轮花瓣中 *CjAG1* 基因的表达量较一致,说明‘金盘荔枝’的内轮花瓣和雄蕊属性密切相关,内轮花瓣可能由雄蕊演变而成。据本实验统计,‘金盘荔枝’内轮聚合花瓣数量大约分别为 100~200 多枚,雄蕊有 0~80 枚,且内轮花瓣中还存在 5~50 枚数量不等的瓣化雄蕊,花瓣和瓣化雄蕊的总量与雄蕊数量存在负相关关系。因此, *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’的瓣化雄蕊和内轮花瓣中的表达模式与重瓣花的“雄蕊起源学说”理论相符合^[17]。瓣化萼片中的特异表达也表明瓣化萼片与雄蕊和花瓣起源上存在必然性联系, *CjAG1* 基因在萼片瓣化中起到调控作用。总体来看, *CjAG1* 基因在‘金盘荔枝’内轮花器官和瓣化特征花器官的特异性高表达现象与山茶的重瓣花特性有关,表明该基因参与了重瓣花形成过程的调控,这为深入研究 *CjAG1* 基因的功能奠定了基础。本实验中 *CjAG1* 基因对于拟南芥突变体的遗传转化结果与该基因在托桂型重瓣花中的特异性表达结果不够统一,可能与草本转基因植株和木本植株存在属性差异及植物表达载体中 *CaMV35s* 启动子表达非特异性有关。在下一步的实验中,拟开展 *CjAG1* 基因对山茶的遗传转化,利用基因的超表达来直接、深入地研究该基因对于山茶花器官发育的调控,分析其在山茶重瓣花形成中的作用。同时,花器官的发育是一个多基因综合调控的结果,进一步挖掘 *CjAG1* 基因的上下游调控途径及花器官发育的基因调控网络,也是明晰重瓣花形成机理的重要研究工作。

参考文献

- [1] Parfitt D, Herbert R J, Rogers H J, *et al.* Differential expression of putative floral genes in *Pharbitis nil* shoot apices cultured on glucose compared with sucrose[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 2169-2177.
- [2] Díaz-Riquelme J, Lijavetzky D, Martínez-Zapater J M, *et al.* Genome-wide analysis of MIKCC-Type MADS box genes in *Grapevine*[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(1): 354-369.
- [3] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [4] Theissen G, Saedler H. Floral quartets[J]. *Nature*, 2001, 409: 469-471.
- [5] Ferrario S, Immink R G, Angenent G C. Conservation and diversity in flower land[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2004, 7: 84-91.
- [6] Kang H, Noh Y, Chung Y, *et al.* Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29(1): 1-10.
- [7] Liu Z, Zhang D, Liu D, *et al.* Exon skipping of *AGAMOUS* homolog *PrseAG* in developing double flowers of *Prunus lannesiana* (Rosaceae)[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(2): 227-237.
- [8] Li Z, Zhang J, Liu G, *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of A-, B-, C- and E-class MADS-box genes in the basal eudicot *Platanus acerifolia*[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(3): 381-393.
- [9] 周兴文. 金花茶花色相关基因的克隆及其功能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- [10] 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.
- [11] Benedito V A, Angenent G C, van Tuyl J M, *et al.* *Lilium longiflorum* molecular floral development: the ABCDE model[J]. *Acta Horticulturae*, 2004, 651: 83-89.
- [12] Wang Y, Zhang X, Liu Z, *et al.* Isolation and characterization of an *AGAMOUS-like* gene from *Hosta plantaginea*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 2875-2881.
- [13] 向林, 秦德辉, 李伯钧, 等. 蕙兰 AG 基因的克隆和表达分析[C]//中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2011: 134-138.
- [14] Hou J, Gao Z, Zhang Z, *et al.* Isolation and characterization of an *AGAMOUS* Homologue *PmAG* from the *Japanese apricot* (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(2): 473-480.
- [15] Savidge B, Rounsley S D, Yanofsky M F. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 721-733.
- [16] 吕山花. 太行花 *MADS-box* 基因克隆、表达模式及功能分析[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [17] 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.

责任编辑: 赵军明

作者: 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福, 范正琪, SUN Yingkun, LI Jiyuan, YIN Hengfu, FAN Zhengqi
作者单位: 孙迎坤, SUN Yingkun(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; 青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛 266109), 李纪元, 殷恒福, 范正琪, LI Jiyuan, YIN Hengfu, FAN Zhengqi(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳, 311400)
刊名: 热带作物学报 
英文刊名: Chinese Journal of Tropical Crops
年, 卷(期): 2013, 34(9)
被引用次数: 2次

参考文献(17条)

1. Parfitt D; Herbert R J; Rogers H J Differential expression of putative floral genes in Pharbitis nil shoot apices cultured on glucose compared with sucrose 2004
2. Díaz-Riquelme J; Lijavetzky D; Martínez-Zapater J M Genome-wide analysis of M1KCC-Type MADS box genes in Grapevine 2009(01)
3. Coen E S; Meyerowitz E M The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development 1991
4. Theissen G; Saedler H Floral quartets 2001
5. Ferrario S; Immink R G; Angenent G C Conservation and diversity in flower land 2004
6. Kang H; Noh Y; Chung Y Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco 1995(01)
7. Liu Z; Zhang D; Liu D Exon skipping of AGAMOUS homolog PrseAG in developing double flowers of Prunus lannesiana (Rosaceae) 2013(02)
8. Li Z; Zhang J; Liu G Phylogenetic and evolutionary analysis of A-, B-, C- and E-class MADS-box genes in the basal eudicot Platanus acerifolia 2012(03)
9. 周兴文 金花茶花色相关基因的克隆及其功能研究 2012
10. 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 2011
11. Benedito V A; Angenent G C; van Tuyl J M Lilium longiflorum and molecular floral development: the ABCDE model 2004
12. Wang Y; Zhang X; Liu Z Isolation and characterization of an AGAMOUS-like gene from Hosta plantaginea 2012(03)
13. 向林; 秦德辉; 李伯钧 蕙兰AG基因的克隆和表达分析 2011
14. Hou J; Gao Z; Zhang Z Isolation and characterization of an AGAMOUS Homologue PmAG from the Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) 2011(02)
15. Savidge B; Rounsley SD; Yanofsky MF TEMPORAL RELATIONSHIP BETWEEN THE TRANSCRIPTION OF TWO ARABIDOPSIS MADS BOX GENES AND THE FLORAL ORGAN IDENTITY GENES[外文期刊] 1995(6)
16. 吕山花 太行花MADS-box基因克隆、表达模式及功能分析[学位论文] 2006
17. 赵印泉, 刘青林 重瓣花的形成机理及遗传特性研究进展[期刊论文]-西北植物学报 2009(4)

引证文献(2条)

1. 丁岳炼, 赵鸿杰, 柯欢, 陈杰 山茶花翻译控制肿瘤蛋白CjTCTP基因的电子克隆及生物信息学分析[期刊论文]-黑龙江农业科学 2014(08)
2. 田云芳, 袁秀云, 蒋素华, 马杰, 崔波 高等植物的花发育模型及其基因调控研究进展[期刊论文]-贵州农业科学 2014(11)

引用本文格式: 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福, 范正琪, SUN Yingkun, LI Jiyuan, YIN Hengfu, FAN Zhengqi 托桂型茶花‘金盘荔枝’中花器官发育基因CjAG1的克隆与功能分析[期刊论文]-热带作物学报 2013(9)