

# 金钗石斛*SEP3-like*基因的克隆及其在春化过程中的表达分析

陈敏燕, 郭无瑕, 刘小如, 李洪清, 梁山\*

(广东省植物发育工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

**摘要:** 通过同源克隆从低温春化处理的金钗石斛腋芽中分离到 1 个 *SEP3-like* 基因的全长 cDNA。该 cDNA 含有长度为 684 bp 的开放阅读框, 可编码由 227 个氨基酸组成的蛋白质。同源搜索和系统进化分析表明, 该蛋白与拟南芥 AtSEP3 同源, 并同属于 MADS-BOX 家族的 SEP 亚家族中的 SEP3 分支, 故将该基因暂定名为 *DnSEP3-like*。与其它的石斛属的 SEP3 蛋白类似, *DnSEP3-like* 蛋白缺失 C-末端的部分基序。*DnSEP3-like* 基因的表达受春化作用的影响, 其转录产物随春化时间延长逐渐积累, 在春化 20 d 时达到峰值, 暗示该基因可能参与春化调控开花的生物学过程。

**关键词:** 金钗石斛; *SEP3*; 春化作用

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup>9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 08-1579-10

## A *SEP3-like* Gene in *Dendrobium nobile* (*DnSEP3-like*): Cloning, Characterization and Vernalization-induced Transcription Patterns

CHEN Min-yan, GUO Wu-xia, LIU Xiao-ru, LI Hong-qing, and LIANG Shan\*

(Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** Vernalization is required for floral transition in *Dendrobium nobile*. From the axillaries of vernalized *D. nobile*, a full-length cDNA that predictably encode a peptide in length of 227AA was identified in this study. BlastX searching indicates it is similar to AtSEP3 and the following phylogenetic analysis indicates both of them belong to the SEP3 clade in SEP subfamily. Thus, this protein was named DnSEP3-like. DnSEP3-like protein lacks a certain motif in C-region, which is similar to some other SEP3 proteins in *Dendrobium* species. Expression of *DnSEP3-like* gene is up-regulated with the extending of vernalization, suggesting that it would function in vernalization-induced floral transition.

**Key words:** *Dendrobium nobile*; *SEP3*; vernalization

许多植物需要经历一段时间的低温, 即春化作用, 才能实现从营养生长到生殖生长的转变。在双子叶植物拟南芥中, 春化作用通过 4 条主要的途径控制成花转变, 包括 *FLC* 途径、*AGL24* 途径、*AGL19* 途径和 *MAF2* 途径 (Alexandre & Hennig, 2008; Kim et al., 2009)。而在单子叶植物, 如小

收稿日期: 2010-10-18; 修回日期: 2011-07-14

基金项目: 国家自然科学基金—广东省自然科学基金联合项目 (u0731006); 广东省植物发育工程重点实验室开放基金项目 (200801); 广东省自然科学基金项目 (10451063101005250)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liangsh@scnu.edu.cn)

麦和大麦, *VRN1* 途径是目前已经确证的控制开花时间的方式 (Kim et al., 2009)。在这些低温控制开花的调控途径中, 主要的组分 *FLC*、*AGL19*、*AGL24* 和小麦 *VRN1* 都属于 *MADS-BOX* 蛋白, 其典型的蛋白结构特征是在 N-端有一个保守的 *MADS-BOX* 结构域, 负责这类转录因子与 DNA 的结合以及蛋白质复合体的形成。

*SEP* 类基因构成植物 *MADS-BOX* 基因家族的一个亚家族 (Becker & Theissen, 2003), 该亚家族成员编码一类 Type II *MADS-BOX* 蛋白, 包括 *SEP1*、*SEP2*、*SEP3* 和 *SEP4* 蛋白。典型的 *SEP* 蛋白除包含保守的 *MADS-BOX* 结构域外, 还包含一个 *K-BOX* 结构域, 位于两者之间的 I 区域以及 C-端的 C-区。I 区和 *K-BOX* 域参与蛋白质的多聚化; C-区在不同的 *MADS-BOX* 蛋白间保守性较低, 可能参与调节靶基因转录活性和复合体的形成等 (Egea-Cortimes et al., 1999; de Folter & Angenent, 2006)。*SEP* 蛋白往往还包含不同的 *SEP I* 或 *SEP II* 基序 (Kanno et al., 2006)。*SEP* 蛋白参与花器官发育和形成, 为花瓣、雄蕊和心皮发育所必需 (Pelaz et al., 2000)。另有研究表明, 拟南芥 *SEP3* 蛋白可能还参与植物的成花诱导过程 (Immink & Richard, 2009)。然而尚无 *SEP* 基因参与春化控制开花的报道。

金钗石斛为单子叶植物, 属兰科石斛属, 是中医中常见的药用植物, 同时也是花卉市场上的热销兰花品种。自然生长的金钗石斛需要几年时间的营养生长, 并经过冬季低温后, 在 3—5 月开花。为了缩短其生长周期, 尤其是适应花卉市场的应节需要, 生产上往往在 9—10 月人工低温处理 35~40 d 左右, 刺激其提前在次年的 1—2 月开花。然而低温诱导金钗石斛提前开花的分子机制是什么, 目前尚一无所知。本研究中以金钗石斛为研究材料, 利用同源克隆策略, 从金钗石斛腋芽中分离到 *SEP3* 类的 *MADS-BOX* 蛋白基因, 以期为后续研究金钗石斛开花时间控制的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

金钗石斛由华南师范大学叶庆生教授提供。盆栽金钗石斛培养于温室中, 于自然条件下生长。2009 年 10 月, 挑选已经封顶的金钗石斛转移至可控温的培养室中进行低温处理。利用自然光照, 控制日夜温度分别为 15 和 10 °C 进行春化处理。收集低温处理 0、5、10、20 和 30 d 后的金钗石斛腋芽, 立即用液氮冰冻, 然后转移于 -80 °C 冰箱中长期保存。

### 1.2 RNA提取和逆转录

利用 Fu 等 (2004) 的方法提取金钗石斛花芽总 RNA。以总 RNA 为模板, 通过 SMART™ 技术 (Clontech) 和 MMLV 逆转录酶 (TaKaRa) 逆转录获得 cDNA 第 1 链。理论上, 逆转录产物中含有较高比例的全长 cDNA, 并且在每个 cDNA 的 5'端和 3'端具有特定接头序列 CDIII 和 SMART IV™ Oligonucleotide, 有利于设计引物以分离基因。

### 1.3 金钗石斛 *SEP3* 基因 *MADS-BOX* 区域的克隆

在 GenBank 上查询获得多个蝴蝶兰、石斛兰和水稻、拟南芥的 *MADS-BOX* 基因序列。经过比较表明, 兰科植物的 *MADS-BOX* 基因与水稻比较接近。下载兰科植物和水稻等的 *MADS-BOX* 蛋白序列, 进行序列比对。根据比对结果设计了 6 条简并引物, 构成了 3 对巢式引物对, 通过巢式 PCR 分离金钗石斛的 *MADS-BOX* 基因的 *MADS-BOX* 结构域的部分序列。引物的序列和结合位点见表 1 和图 1。所得 PCR 产物克隆到 T-载体后送华大公司测序。

表 1 使用的引物和序列  
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer	序列 (5'→3') Sequence	长度/mer Length
MADS-6	ATGGGRAGRGGRAAGATKGARHTNAA	26
MADS-7	AARATHAAYMGNCARGTNAC	20
MADS-8	GGBYTNYTNAARAARGC	17
MADS-R1	TCNARYTGRTCNARYTCYTT	20
MADS-R2	WRTCNAARTCYTCNCC	16
MADS-R3	CAYTTYTGRTANCKYTC	17
3'RACE GSP1	ACGAACTTTCCGTCCTCT	18
3'RACE GSP2	AGCCGAAGTATGTTGAAGAC	20
5'RACE GSP1	CTCCAAAGGGTGGTAGAAGT	20
5'RACE GSP2	CTCCTCCAATCTTGTCTCA	20
CDIII/3'PCR primer*	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T) <sub>30</sub> N <sub>-1</sub> N (N = A, G, C or T; N <sub>-1</sub> = A, G or C)	59
SMART IV™ Oligonucleotide*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGCCATTACGGCCGGG	39
5'PCR primer*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	23
AGL9 FW	ACGAACTTTCCGTCCTCT	18
AGL9 RE	AATCATCCACTCTAAAACTTGA	23
AGL9-qF	ACATCTCTAGGTGGAAGTTAAG	22
AGL9-qR	GTTGTTGTTCAAATCATCCACT	22
18S-F	GGTTCGCTGCTCGTACTCT	20
18S-R	CAGGCACCGCTTATTTTACA	21

注：含\*标记的引物根据 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual (PT3577-1) 提供的序列信息合成 (广州英骏)。  
Note: \* These primers were synthesized following the instruction of the Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontech) .

1.4 *SEP3* 基因的全长cDNA序列的扩增

根据 1.3 所得的 MADS-BOX 序列设计基因特异引物，以金钗石斛花芽 cDNA 为模板，采用 3' 和 5'RACE 策略，进行两轮巢式 PCR 反应，分离 MADS-BOX 基因的 cDNA 全长并测序。3'RACE 基因特异引物与逆转录产物 3'端接头的引物 (CDIII/3'PCR primer) 构成引物对，而 5'RACE 基因特异引物与 5'端接头引物 (5'PCR primer) 构成引物对 (表 1)。为验证 *SEP3* 转录产物，另设计了 1 对引物 (AGL9 FW/AGL9 RE) 用于通过 PCR 扩增全长 cDNA。

1.5 定量PCR检测低温处理花芽中的*SEP3-like*基因的表达

以低温处理的金钗石斛花芽 cDNA 为模板，使用金钗石斛 *SEP3-like* 基因的特异引物对 AGL9-qF/AGL9-qR (表 1) 进行定量PCR反应。18S rRNA基因作为内标基因同时进行定量PCR反应。每 20 μL 的反应体系包含由 5 ~ 7.5 μg总RNA逆转录而得的cDNA，10 μL SYBR Green Premixture (TaKaRa) and 0.4 μL Rox (TaKaRa) 以及 250 nmol · L<sup>-1</sup>的基因特异引物。PCR反应程序为：95 °C 预变性 30 s，然后进行 40 循环的 95 °C，5 s；62 °C，31 s。为获得较为准确的结果，设置了技术性重复和生物学重复，即每个PCR反应进行 3 次重复，每个处理也使用 3 个不同批次提取的总RNA样品。当所有定量PCR反应结束后，使用ABI PRISM1 7300 (Applied Biosystems) 自带的SDS1.3.0 软件对所有反应板获得的数据进行合并分析。

1.6 序列分析

通过 ORF Finder 预测分离所得金钗石斛 *SEP3-like* 全长 cDNA 开放阅读框，并通过 BlastP 和 BlastX 搜索同源蛋白。系统进化分析所使用的序列从 Phytozome v5.0 (<http://www.phytozome.net/>)

和 NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) 下载。使用 MEGA3.0 进行序列比对和系统进化树构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 金钗石斛 *DnSEP3-like* 基因全长 cDNA 的克隆

首先利用简并引物 (图 1), 以金钗石斛腋芽总 RNA 逆转录产物为模板, 通过巢式 PCR 的 3 轮反应 (第 1 轮采用 MADS6/MADS-R1 引物对, 第 2 轮采用 MADS7/MADS-R2 引物对, 第 3 轮采用 MADS8/MADS-R3 引物对) 扩增了 MADS-BOX 基因的 MADS-BOX 序列, 经克隆测序获得长度约为 140 bp 的片段 (图 2, A)。BlastX 同源搜索表明该片段编码 MADS-BOX 的部分序列。

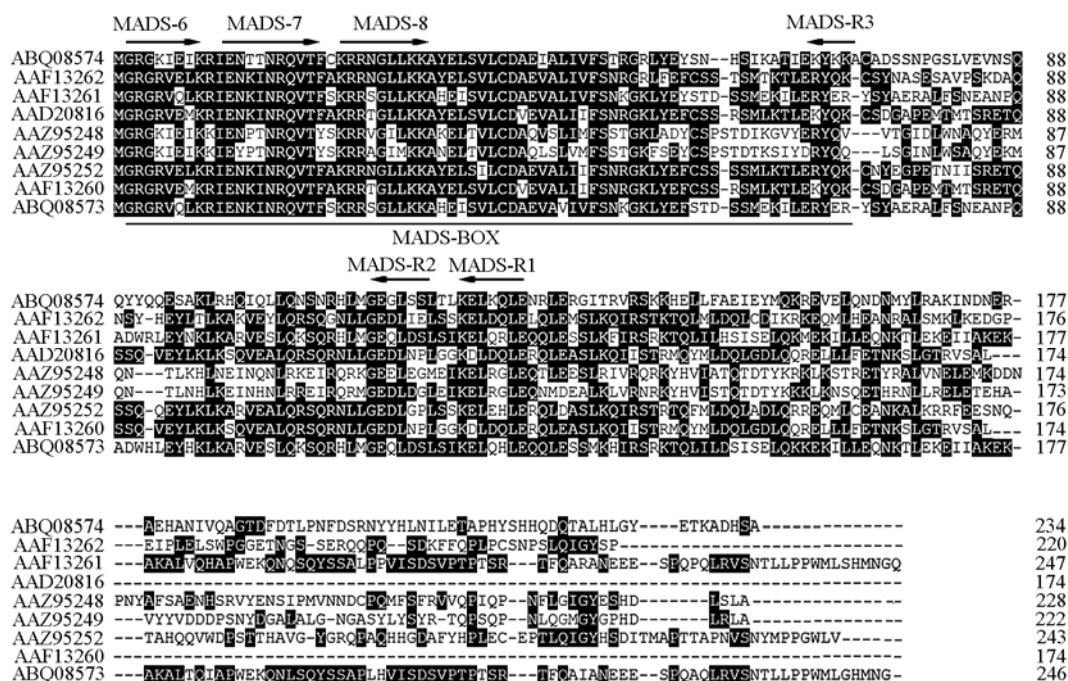


图 1 简并引物的结合位点示意图

箭头表示引物的结合位点和方向。

Fig. 1 Binding sites of the degenerate primers

The arrows indicate the position and orientation of the primers.

根据这一 MADS-BOX 片段设计了基因特异引物, 并通过 RACE 扩增 MADS-BOX 基因全长序列。3'RACE 扩增获得两条长度分别介于 600 ~ 700 bp 和 500 ~ 600 bp 的 3'末端片段 (图 2, B)。较短片段在后面的验证试验中未获得证实, 因此本研究中只考虑较长的片段。将该片段克隆测序, 所得序列与 MADS-BOX 部分序列有约 50 bp 的重叠。两序列拼接获得包括了 3'末端的 cDNA 片段。根据这一序列设计 5'RACE 的基因特异引物, 通过两轮 5'RACE 扩增获得 1 条 600 ~ 700 bp 的 5'末端片段 (图 2, C)。经克隆测序表明, 该片段可与 3'RACE 产物拼接得到 905 bp 的 cDNA 序列 [不包括 3'端的 Poly (A) 尾]。BlastX 搜索表明该序列编码的蛋白序列与已知的拟南芥 SEP3 同源, 氨基酸序列一致性为 65%, 因此将其命名为 *DnSEP3-like*, 其中 Dn 代表金钗石斛 (*Dendrobium nobile*)。为验证上述结果, 根据拼接后的 *DnSEP3-like* 序列重新设计引物, 通过 RT-PCR 扩增包括完整 ORF 的 cDNA 片段。结果证明, 在金钗石斛腋芽总 RNA 中确实存在 *DnSEP3-like* 的转录本 (图 2, D)。

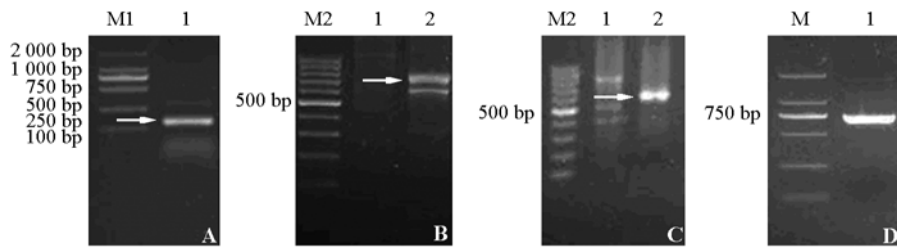


图 2 金钗石斛 *DnSEP3-like* 全长 cDNA 的分离

A: 利用简并引物扩增 MADS-BX 保守区域; B: *DnSEP3-like* cDNA 3'末端的扩增, 1、2 分别示巢式 PCR 的第 1、2 轮反应; C: *DnSEP3-like* cDNA 5'末端的扩增, 1、2 分别示巢式 PCR 的第 1、2 轮反应; D: *DnSEP3-like* 转录本的 PCR 验证。箭头指示回收测序的目标条带。

Fig. 2 Isolating the full-length *DnSEP3-like* cDNA from *Dendrobium nobile*

A. Amplification of the MADS-BX region using the degenerate primers; B. 3'RACE for the *DnSEP3-like*; C. 5'RACE for the *DnSEP3-like*; D. Amplification of the full-length *DnSEP3-like* cDNA by PCR. The arrows indicate the target bands.

## 2.2 *DnSEP3-like* 基因序列分析

理论上, 通过SMART™技术 (Clontech) 可以合成全长cDNA, 但是实际操作中往往仅有少量的mRNA可以通过逆转录获得全长cDNA。本研究获得的*DnSEP3-like* cDNA全长 905 bp [包括 poly(A)序列时, 长度为 935 bp], 包括部分 5'UTR区、完整的ORF和 3'UTR区 (图 3)。

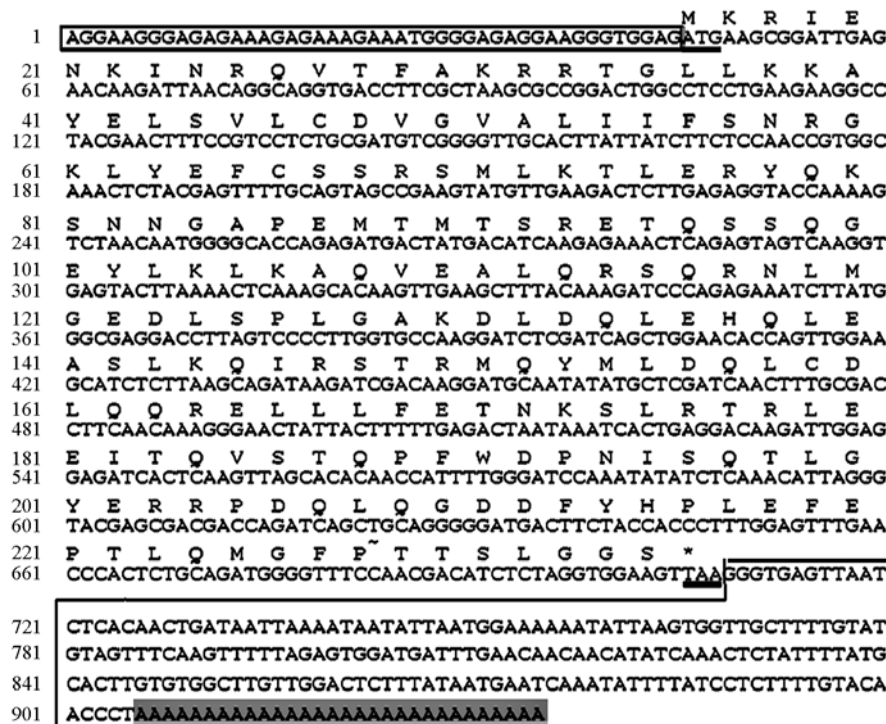


图 3 推测的 *DnSEP3-like* 蛋白的结构特征

框内序列分别为 5'UTR 和 3'UTR 区。下划线标记翻译起始密码和终止密码。  
阴影部分表示 poly(A) 所在位置。

Fig. 3 The deduced amino acid sequence of *DnSEP3-like* protein

5'UTR and 3'UTR regions are framed. Initiation codon and stop codon are underlined.  
The poly(A) tail is shown in shadow.

其中 ORF 长 684 bp, 编码 1 条含 227 个氨基酸残基的多肽链, 含 1 个 MADS-BOX 域和 1 个 K-BOX 域, 为典型的 Type II MADS-BOX 蛋白。5'UTR 区长 24 bp, 可能并不完整, 需要进一步试验确定。3'UTR 区长 197 bp, 在 mRNA 中, 还包括一段 poly(A)尾。

与水稻、拟南芥和小麦的 SEP3 蛋白不同, 金钗石斛 *DnSEP3-like* 蛋白的 C-端只含有 1 个 SEP I 基序, 而缺乏 SEP II 基序 (图 4)。石斛属的其它 SEP3 蛋白的 C-端也出现类似缺失, 但具有种间差异, 如 *DcSEP1* (木石斛 *Dendrobium crumenatum*, AAZ95252.1) 含有 SEP I 基序和部分 SEP II 基序 (图 4), 而 *DOMADS1* (石斛兰 *Dendrobium grex Madame Thong\_In*, AAF13260.1) 则同时缺失两个基序 (Zahn et al., 2005)。石斛属植物 SEP3 蛋白 C-端基序的缺失及其缺失模式暗示 SEP3 蛋白在石斛属中特异的功能分化。

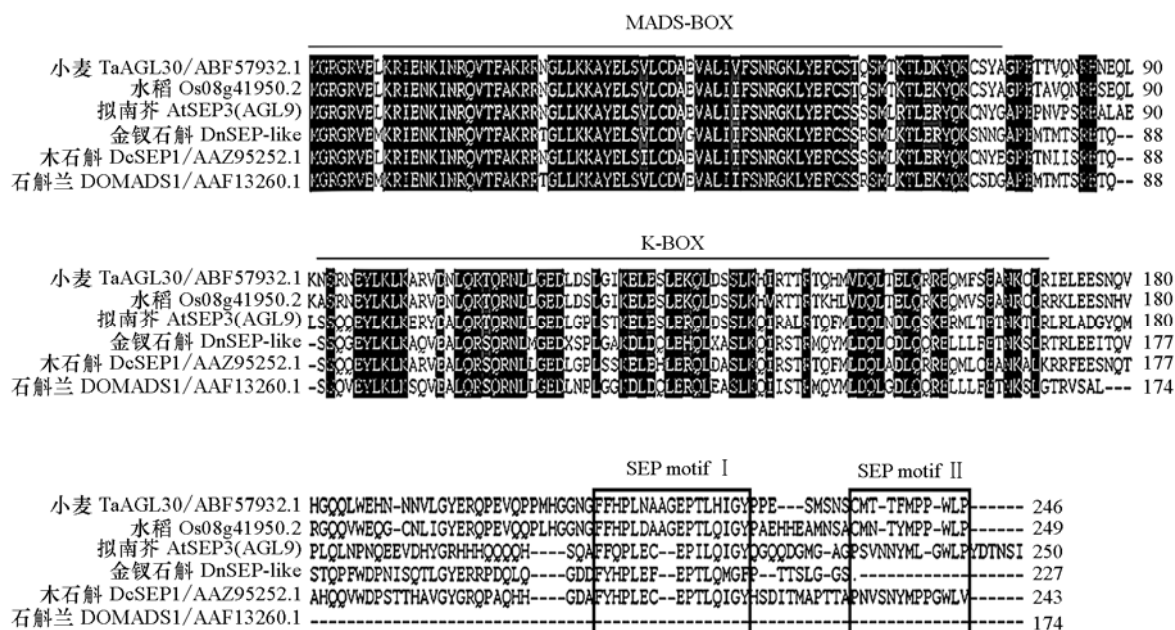


图 4 三个石斛属物种的 SEP3 蛋白与其它物种 SEP3 的比对

Fig. 4 Alignment of SEP3 proteins from *Dendrobium* genus and other organism

### 2.3 *DnSEP3-like*蛋白的系统进化分析

为进一步确定 *DnSEP3-like* 蛋白与其它物种相似蛋白的同源性并分析这些蛋白质之间的进化关系, 以 *DnSEP3-like* 和 *AtSEP3* 为查询条件从 Phytozome v5.0 和 NCBI 搜索并下载了同源序列, 并用 MEGA3.0 进行序列比对和 NJ 树构建 (图 5)。

结果表明, 相对于拟南芥 *AtSEP1*、2、4 而言, *DnSEP3-like* 与拟南芥 *AtSEP3* 距离最近, 与其它物种的 SEP3 蛋白构成一枝并与 SEP1/2 和 SEP4 分离。SEP3 分枝中, 单子叶植物和双子叶植物的 SEP3 蛋白各自聚集; 两个石斛属物种 (兰科, 单子叶植物) 的 SEP3 虽与双子叶植物 SEP3 蛋白聚集, 但独立于双子叶植物的亚枝之外, 处于单子叶和双子叶植物之间。

### 2.4 *DnSEP3* 基因在金钗石斛花芽中的低温诱导表达模式

金钗石斛需要春化作用诱导开花。通过定量 PCR 检测了金钗石斛侧芽中 *DnSEP3-like* 基因的转录在春化处理过程中的变化。

结果表明, 低温处理前期, *DnSEP3-like* 基因的转录变化较小, 只有少量的增强; 处理 10 d 后, *DnSEP3-like* 基因的转录增强, 为未处理状态的 1.46 倍; 当低温处理延续至 20 d 时, *DnSEP3-like* 基因的转录急剧增强, 是未处理状态的 3.88 倍; 其后, 春化时间继续延长至 30 d 后, 其转录水平有所下调, 恢复到未处理状态的水平 (图 6)。 *DnSEP3-like* 转录在春化过程中的变化可能与其在开花控制的不同阶段的功能有关。 *DnSEP3-like* 基因在叶片中也有表达, 但是相对于腋芽而言, *DnSEP3-like* 基因的转录水平很低 (图 6)。

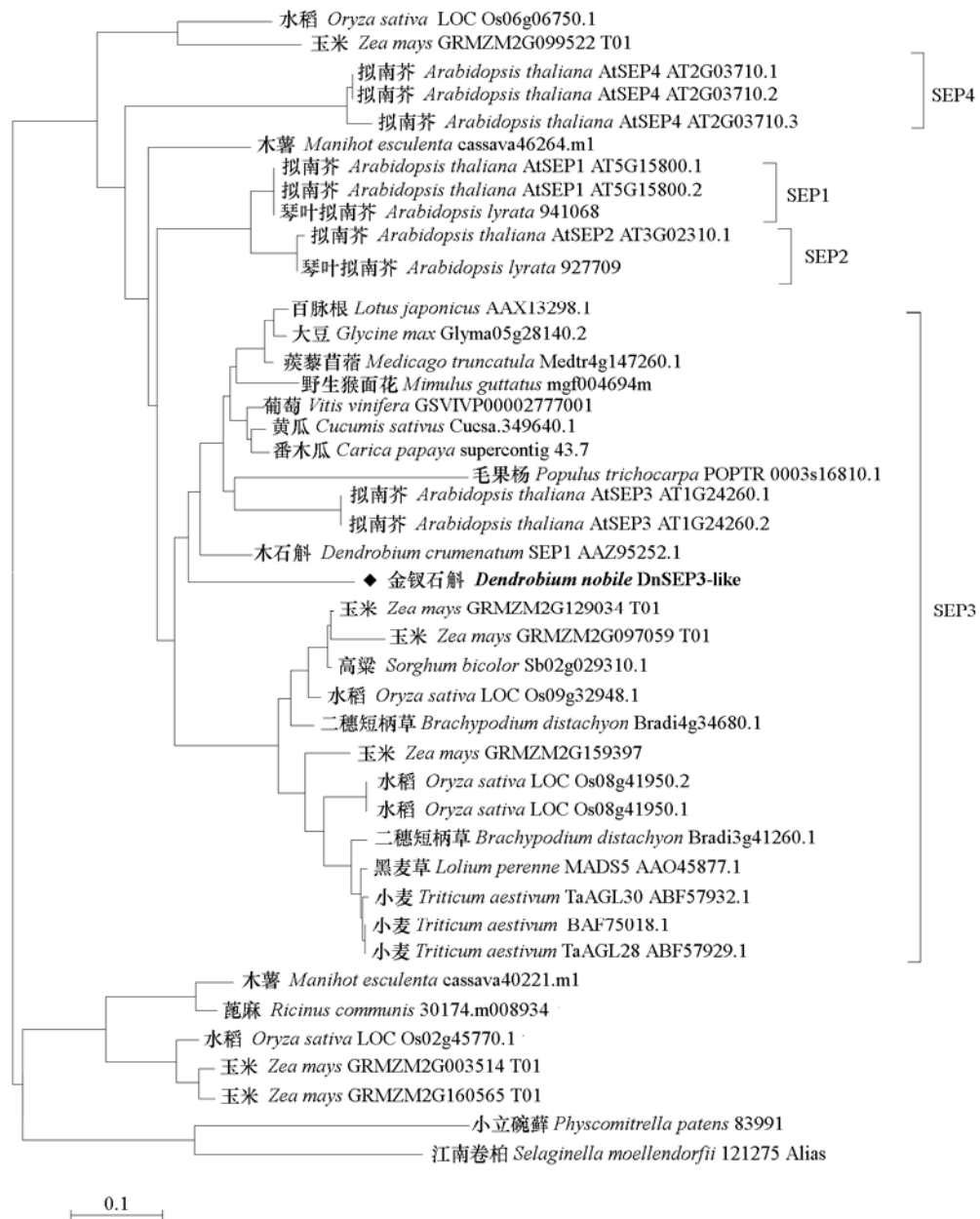


图 5 SEP 蛋白的系统进化分析

紧接在物种名后的为蛋白在 GenBank 或 Phytoome v5.0 上的登记号。

Fig. 5 Phylogenetic analysis of SEP proteins

The accession No. in GenBank or Phytozome v5.0 is next to the scientific names of the organism.

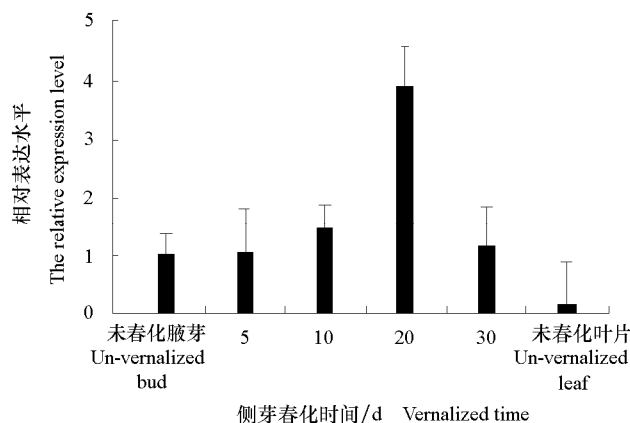


图 6 *DnSEP3-like* 基因在春化过程中的表达变化

18S rRNA 基因作为内标基因。相对表达水平为相对于对照的表达变化的倍数。

Fig. 6 Time-course expression of *DnSEP3-like* during vernalization process

The 18S rRNA gene was used as endogenous control. Expression level of *DnSEP3-like* gene at each time point during vernalization or in un-vernalized leaf tissue was calibrated by that in un-vernalized bud.

### 3 讨论

#### 3.1 *DnSEP3-like* 基因编码 SEP3 类 MADS-BOX 蛋白

ABC 模型认为,植物花器官结构的决定和发育由 A、B、C 等类型的蛋白质负责 (Bowman et al., 1991; Coen & Meyerowitz, 1991; Meyerowitz et al., 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994)。Causier 等 (2010) 研究发现,除了这 A、B、C 类蛋白质外, D 类和 E 类蛋白也参与花器官的发育。SEP3 蛋白属于 E 类 (E-class) 蛋白,可以与其它蛋白质 (如 B、C 类蛋白) 构成复合体影响花器官的形成 (Pelaz et al., 2000; Liu et al., 2009; Bemer & Angenent, 2010)。SEP3 蛋白含有典型的 MADS-BOX 蛋白的结构特征,包括位于 N-端的 MADS-BOX 和相对靠近 C-端的 K-BOX 结构域。MADS-BOX 结构域负责蛋白质与 DNA 的结合,而 K-BOX 负责蛋白质与蛋白质之间的相互作用。位于 MADS-BOX 和 K-BOX 之间的区域可能与蛋白质的二聚化有关 (Egea-Cortimes et al., 1999; Shchennikova et al., 2004; de Folter & Angenent, 2006)。多数 SEP3 蛋白的 C-端具有一些保守基序,包括 SEP I 和 SEP II 基序,这些基序可能参与转录激活或高阶复合体 (high order complex) 的形成 (Malcomber & Kellogg, 2005; Zahn et al., 2005)。

在本研究中通过同源克隆分离到 1 个 SEP 类蛋白的全长 cDNA。系统进化分析和蛋白结构分析均表明这个 cDNA 编码 SEP3 类蛋白,因此暂时命名为 *DnSEP3-like* (GenBank 登录号: HQ388352)。与其它物种的 SEP3 蛋白相比,推测的 *DnSEP3-like* 蛋白的 C-端只含有 SEP I 基序,而缺乏 SEP II 基序。具有类似 C-端结构特征的 SEP3 蛋白还有 *LpMADS6* (*Lolium perenne*)、*DcSEP1* (*Dendrobium crumenatum*)、*DOMADS1* (*Dendrobium grex Madame Thong\_In*)、*AOMADS3* (*Asparagus officinalis*) 和 *AVMADS3* (*Asparagus virgatus*) (Kanno et al., 2006)。MADS-BOX 蛋白 C-端的被认为与转录激活、高阶蛋白质复合体的形成、DNA 特异性识别、亚细胞定位和相互作用伙伴的吸引等有关 (Vandenbussche et al., 2003)。因此,SEP3 C-端基序的缺失可能造成转录激活功能的下降或缺陷。另外,SEP 蛋白 C-端基序的多样性表明了进化中 SEP 蛋白功能的多样化 (Malcomber & Kellogg, 2005),其中高度保守的 SEP I 基序可能是代表祖先基序的功能,而其它的基序则承担祖先基序的部分功能或产生新的功能。本研究中比较了 3 个石斛属物种的 SEP3 蛋白的 C-端,发现它们分别有



不同类型的基序缺失模式并且使石斛属物种的 *SEP3* 蛋白与其它物种分离开来。广泛调查这些缺失在石斛属植物中的模式和研究这种缺失对 *SEP3* 蛋白的功能的影响是非常有趣的课题。

### 3.2 *DnSEP3-like* 基因的表达受到春化作用的影响

*DnSEP3-like* 基因在低温处理前后的金钗石斛腋芽中均有表达。随着春化处理的时间延长, *DnSEP3-like* 基因在腋芽中的转录逐渐增强, 在春化处理 20 d 后达到高峰, 表明春化作用影响 *DnSEP3-like* 基因的表达。这一结果是我们目前能了解到的 *SEP3* 类基因在春化过程中的表达变化的首次报道。这个结果为 *SEP3* 类基因与春化联系起来提供了线索。一般认为, *SEP3* 基因作为 E 基因参与花器官结构的形成和发育。然而最近的一些研究表明, *SEP3* 蛋白可能也参与开花时间控制。比如, 有假说认为, *AtSEP3* 可能通过与开花促进因子 *OC1* 和 *AGL24* 发生蛋白质—蛋白质或蛋白质—靶基因之间的相互作用而对成花转变过程进行负控制 (de Folter et al., 2005; Kaufmann et al., 2009)。然而, 目前为止, 没有研究报道春化调控开花的过程中有 *SEP3* 类基因的参与。*SEP3* 除了与控制成花转变的成分发生联系外, 还可能在同一种复合体中结合花发育控制的成分, 因此有假说认为 *SEP3* 在这种同时结合了成花转变和花器官发育调控成分的复合体中承担了正、负控制两种功能 (de Folter et al. 2005)。在我们的前期研究中, 通过分析春化过程中表达的基因的 EST 数据, 发现金钗石斛春化 20~30 d 时, 与花发育相关的基因表达显著富集, 表明该阶段可能为成花诱导至花器官发育的转折期。如果 de Folter 的假说 (de Folter et al., 2005) 为真, 可以猜想, *DnSEP3* 在春化过程中的转录变化, 尤其是春化 20 d 后的高表达, 可能与成花转变有关蛋白的抑制和后续促进花器官决定有关。但是以上假说需要更多的直接的试验证据来证实或证伪。

### References

- Alexandre C M, Hennig L. 2008. FLC or not FLC: The other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1127 - 1135.
- Becker A, Theissen G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 464 - 489.
- Bemer M, Angenent G C. 2010. Floral organ initiation and development. *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*. Heidelberg: Springer Berlin.
- Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*, 112: 1 - 20.
- Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B. 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21 (1): 73 - 79.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 - 37.
- de Folter S, Immink R G H, Kieffer M, Parenicova L, Henz S R, Weigel D, Bussche M, Kooiker M, Colombo L, Kater M M. 2005. Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *The Plant Cell*, 17: 1424 - 1433.
- de Folter S, Angenent G C. 2006. Trans meets cis in MADS science. *Trends in Plant Science*, 11: 224 - 231.
- Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H. 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal*, 18: 5370 - 5379.
- Fu X H, Deng S L, Su G H, Zeng Q G, Shi S H. 2004. Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reports*, 22: 197a - 197e.
- Immink R, Tonaco I, De Folter S, Shchennikova A, van Dijk A, Busscher-Lange J, Borst J, Angenent G. 2009. SEPALLATA3: The 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology*, 10: R24.
- Kanno A, Hienuki H, Ito T, Nakamura T, Fukuda T, Yun P Y, Song I J, Kamimura T, Ochiai T, Yokoyama J. 2006. The structure and expression of *SEPALLATA-like* genes in *Asparagus* species (*Asparagaceae*). *Sexual Plant Reproduction*, 19: 133 - 144.

- Kaufmann K, Muiño J M, Jauregui R, Airolti C A, Smaczniak C, Krajewski P, Angenent G C. 2009. Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3*: Integration of developmental. *PloS Biology*, 7 (4): e1000090.
- Kim D H, Doyle M R, Sung S, Amasino R M. 2009. Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25: 277 – 299.
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H. 2009. Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental cell*, 16: 711 – 722.
- Malcomber S T, Kellogg E A. 2005. *SEPALLATA* gene diversification: Brave new whorls. *Trends in Plant Science*, 10: 427 – 435.
- Meyerowitz E M, Bowman J L, Brockman L L, Drews G N, Jack T, Sieburth L E, Weigel D. 1991. A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 113: 157.
- Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E, Yanofsky M F. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 405: 200 – 203.
- Shchennikova A V, Shulga O A, Immink R, Skryabin K G, Angenent G C. 2004. Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-Box genes, belonging to the *APETALA1/FRUITFULL* and *SEPALLATA3* subfamilies. *Plant Physiology*, 134: 1632 – 1641.
- Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, Gerats T. 2003. Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Research*, 31: 4401.
- Weigel D, Meyerowitz E M. 1994. The ABCs of floral homeotic genes: Review. *Cell*, 78: 203 – 209.
- Zahn L M, Kong H, Leebens-Mack J H, Kim S, Soltis P S, Landherr L L, Soltis D E, Depamphilis C W, Ma H. 2005. The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: A pre-angiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics*, 169: 2209 – 2223.

征 订

## 欢迎订阅 2012 年《烟台果树》

《烟台果树》是烟台市农科院果树科学研究所主办的果树专业性季刊。立足北方水果的主产区山东烟台，面向全国。经过 32 年的发展，《烟台果树》已成为我国广大果树业者新观点、新品种、新技术的交流平台，也是苗木、农药、肥料及各种生产机具等信息发布的平台。期刊发行量大、覆盖面广。

每期定价 4 元，全年仅需 16 元。每季度首月 15 日发行。若挂号，全年 28 元。全国各地邮局均可订阅，邮发代号为 24-107；也可随时直接汇款至编辑部订阅。

汇款地址：山东省烟台市环山路 145 号；邮编：264008

单位名称：《烟台果树》编辑部；联系人：梁志清

电话：0535 – 6236524；传真：0535 – 6615052

E-mail: ytgshjb@163.com; ytgsgg@163.com

本刊网址：www.fruitworld.com.cn 或水果世界网