

# 建兰 *API* 基因的克隆、表达及其与 *MADS-box* 转录因子相互作用的分析

吴菁华, 吴少华\*, 杨超, 张志忠

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

**摘要:** 为研究 *API/SQUA* 类 *MADS-box* 基因在建兰花发育中作用, 以‘四季大青’建兰花芽为材料, 用 RT-PCR 和 RACE 技术获得 *API* 基因, 命名为 *CeAPI*。序列分析表明, *CeAPI* 基因 cDNA 全长 866 bp, 其开放阅读框编码一个含 241 个氨基酸的蛋白质。通过蛋白序列比对发现 *CeAPI* 与兰科植物的 *API* 蛋白质同源性较高。荧光定量 PCR 分析表明, *CeAPI* 基因在建兰花发育初期高水平表达, 同时在营养器官中也表达。酵母双杂交试验分析显示, *CeAPI* 能自身形成同源二聚体, 同时也能与除 *CeAG1* 外的其他 *MADS-box* 发生相互作用。

**关键词:** 建兰; 花发育; *API* 同源基因; 相互作用

**中图分类号:** S 682.31

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 10-1935-08

## Cloning and Expression Analysis on *API* Homologous Gene from *Cymbidium ensifolium* and Interaction Analysis Between *API* and *MADS-box* Transcription Factors

WU Jing-hua, WU Shao-hua\*, YANG Chao, and ZHANG Zhi-zhong

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** To investigate the function of *API* genes on flower development in *Cymbidium ensifolium*, *API* was cloned from ‘Sijidaqing’ flower buds and the full length of *API* cDNA was amplified by RACE method, named *CeAPI*. *CeAPI* is 866 bp in length with a 726 nucleotides ORF that putatively encodes a protein with 241 amino acids. Homology analysis showed that the *CeAPI* was highly homologous to the *API/MADS-box* genes of orchids. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that *CeAPI* was expressed in the initial period of floral development and vegetative organs. The yeast two-hybrid analysis indicated that the *CeAPI* was not only able to form homodimer but also formed heterodimers with the other *MADS-box* transcription factors except for *CeAG1*.

**Key words:** *Cymbidium ensifolium*; flower development; *API* homologous gene; interaction

开花受基因和外在环境的共同影响。根据对模式植物拟南芥和金鱼草花发育突变体的研究, Coen 和 Meyerowitz (1991) 在 20 世纪 90 年代初提出了花发育的 ABC 模型。随着研究的不断深入,

收稿日期: 2013-06-26; 修回日期: 2013-09-04

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2009J01066)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: 348279953@qq.com)

ABC 模型发展为 ABCDE 模型 (Theißen, 2001; Theißen & Saedler, 2001)。大部分花器官决定基因是 *MADS-box* 家族基因, 序列进化分析把开花植物的 *MADS-box* 基因分成 12 个家族 (Becker & Theißen, 2003), 其中 *API/SQUA* 家族 (又称作 *API/FUL* 家族) 基因被认为既是花分生组织特征基因, 又是花器官特征基因, 它的家族成员在营养生长到生殖生长的转换和花器官发育中都发挥着重要的作用。

*API/SQUA* 家族基因, 如拟南芥的 *API* 和金鱼草的 *SQUA* 突变常常会引起部分花芽转变以及花瓣、花萼等花器官的变化 (Huijser et al., 1992; Mandel et al., 1992; Bowman et al., 1993; Gustafson-Brown et al., 1994)。拟南芥中的另一个 *API/SQUA* 基因 *CAULIFLOWER* (*CAL*) 与 *API* 基因存在部分功能冗余 (Kempin et al., 1995)。大量的 *API/SQUA* 家族基因异位表达也表明其具有花器官和花分生组织特性决定两个方面的功能。*API* 或其同源异型基因的异位表达会导致拟南芥提前开花 (Mandel & Yanofsky, 1995; Kyoizuka et al., 1997); Chen 等 (2008) 克隆了 3 个百合的 *API* 同源基因, 过量表达这 3 个基因均能使转基因拟南芥提前开花; 苹果的 *MdMADS2* 和兰花的 *OMADS1* 在烟草中异位表达能使其提前开花及花器官变化 (Sung et al., 1999; Hsu et al., 2003)。

中国福建是建兰 (*Cymbidium ensifolium*) 的重要产地之一, 近年来建兰的生产发展较快, 出现一些奇异花型, 极具经济价值。本研究中以建兰花芽为材料, 利用 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆建兰 *API* 基因——*CeAPI*, 研究该基因在建兰不同花器官和花发育过程中的表达模式, 并利用酵母双杂交技术进一步分析了 *CeAPI* 与建兰其它 *MADS-box* 转录因子间的互作, 为揭示 *CeAPI* 基因的功能和在花发育过程中与其它转录因子间相互关系的分子基础提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

试验于 2012 年在福建农林大学园艺学院遗传育种实验室进行。

以建兰‘四季大青’(购于福州市花鸟市场)花蕾为材料, 采用百泰克公司多糖多酚 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, cDNA 第一链合成以 AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)16-3') 为引物, 使用 Ferments 公司的逆转录试剂盒完成, 5'-cDNA 合成采用 Clontech 公司的 SMART™ RACE 试剂盒。

### 1.2 建兰 *API* 基因的克隆

根据单子叶植物的 *MADS-box* 基因设计正向的简并引物 AP11 和反向的 AP12 两个引物, AP11: 5'-GCTGAAGAMGATAGAGAACAAGATC-3'; AP12: 5'-CTGAGCATCC ATGGGGGCAG GC-3', 以花蕾的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得了基因的保守区。根据获得的保守区序列分别设计 5'RACE 和 3'RACE 引物: AP15R1: 5'-CTATGGAATTAAGGAGTAGCTGGGTC-3'; AP15R2: 5'-CGTTT AAGGGTCCAAGATCCTCTCCAAG-3'; AP13R1: 5'-GACCCAGCTACTCCTTAATTCCATAG-3'; AP13R2: 5'-CAAACGATCTTCCAACCCTGAATTTAG-3'。PCR 扩增分别获得该基因的 5'端和 3'端。再设计一对正向引物 APIF (5'-ATGGGGAGGGGGAGAGTTC-3') 和反向引物 APIR (5'-TTAGGTTG AAGAGCGAAGCATCC-3'), 用 RT-PCR 方法分离其 ORF。

### 1.3 序列的生物信息学分析

利用 ExPASy 系统中的 ProtParam 工具 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析建兰 *API* 基因编码氨基酸的基本性质, 然后运用 Blast 搜索其同源基因, 再使用 Mega5 软件对搜索得到

的基因进行多重序列比对, 并构建系统发生树。

#### 1.4 建兰 *API* 基因的表达分析

分别提取建兰‘四季大青’的萼片、花瓣、唇瓣、合蕊柱、花梗、根和叶及大小分别为  $< 0.5$  cm、 $0.5 \sim 1.0$  cm、 $1.0 \sim 2$  cm、 $> 2.0$  cm 花芽、全开花、衰败花的总 RNA, 取  $1 \mu\text{g}$  总 RNA 逆转录后得到 cDNA, 进行荧光定量 PCR 分析。以建兰 *Actin* 基因为内参基因。建兰 *Actin* 基因的引物为 Act1: 5'-CTGCTGGCATTTCATGAGACGACC-3' 和 Act2: 5'-CAATTCCAGGGAACATAGTCGAGCC-3'。*CeAPI* 的引物为 CeAPIYGF: 5'-ATGGATGCTTCGCTCTTCAACC-3' 和 CeAPIYGR: 5'-AGCTCGCATTCAAGAAATCTGGG-3'。实时定量 PCR 的试剂盒为 SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit (TaKaRa)。PCR 反应体积  $20 \mu\text{L}$ , 包括  $2 \mu\text{L}$  cDNA、 $10 \mu\text{L}$   $2\times$  Mix、浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的正反向引物各  $0.4 \mu\text{L}$ , 剩余体积用超纯水补足至  $20 \mu\text{L}$ 。每个反应重复 3 次。定量 PCR 反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  3 min;  $95^{\circ}\text{C}$  5 s,  $59^{\circ}\text{C}$  20 s, 50 个循环。定量 PCR 使用罗氏 LightCycler 1.5 定量 PCR 仪。以清水为阴性对照, 每试验 3 次重复。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算相对表达量的高低。

#### 1.5 *CeAPI* 与其它 MADS-box 转录因子相互作用的分析

将建兰 *CeAPI* 全长编码区 cDNA 连接到 pGADT7 酵母表达载体中, 构建 AD-*CeAPI* 载体, 引物为 ADAP1 (5'-CCGGAATTCATGGGGAGGG GGAGAGTTCAG-3') 和 ADAP2 (5'-CGCGGATCCTTAGGTTGAAG AGCGAAG-3')。另一方面, 将建兰 *CeAPI* 及从建兰 cDNA 文库中获得的其它与花发育相关的 MADS-box 基因 *CeAP31*、*CeAP32*、*CePII*、*CeAG1*、*CeSTK*、*CeSEP3* 和 *CeAGL6* 分别连接到酵母表达载体 pGBDT7 中, 构建 BD-*CeAPI*、BD-*CeAP31*、BD-*CeAP32*、BD-*CePII*、BD-*CeAG1*、BD-*CeSTK*、BD-*CeSEP3* 和 BD-*CeAGL6*。酵母双杂交系统参照 Clontech 公司说明书, 酵母菌株为 AH109, 采用醋酸锂转化法进行酵母的转化。将酵母克隆接种在加有 X-Gal 的 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 四缺培养基上, 正常生长且显蓝色为阳性结果。

## 2 结果与分析

#### 2.1 建兰 *API* 全长 cDNA 的克隆

根据 *API* 保守序列设计引物, 以建兰花蕾 cDNA 为模板, 扩增得到一个  $700 \text{ bp}$  左右的保守区片段, 测序结果表明, 该片段具有 MADS-box 基因的保守区, 与其它植物 *API* 基因有一定的相似性。用 RACE 法分别获得 3'端  $250 \text{ bp}$  和 5'端  $300 \text{ bp}$  左右的目的片段, 最后通过序列拼接得到全长  $866 \text{ bp}$  序列 (图 1)。RT-PCR 方法分离的 ORF 为  $726 \text{ bp}$ , 与拼接的结果一致。ORF 编码一个含 241 个氨基酸的蛋白质, 蛋白结构域分析表明 *API* 蛋白含有典型的 MADS 结构域和 K 结构域两个保守结构域。将此序列命名为 *CeAPI*, 并在 GenBank 注册, 登录号为 JX255735。

#### 2.2 *API* 基因的生物信息学分析

预测 *CeAPI* 编码的蛋白的分子量是  $27.7 \text{ kD}$ , 理论等电点 9.65。*CeAPI* 推定的氨基酸序列与文心兰的 *MADS10* (HM140846)、萼脊兰的 *MADS1* (JQ776636) 和球花石斛的 *DthyFL2* (AY927237) 等兰花的 *API* 都具有较高的相似性, 与其它单子叶植物也有一定的相似性。如华山姜 (ABS83558)、油棕 (AAQ03221)、麝香百合 (ADT78583) 和郁金香 (BAJ09452) 的 *API* 氨基酸序列的同源性也达到 65%、65%、61% 和 60%。图 2 是 *CeAPI* 基因推定的氨基酸序列与其他物种 *API* 基因的氨基酸序列比对结果, 结果显示 *API* 氨基酸序列的 5'端保守性较高, 而 3'端保守性较低, 这是 MADS-box

基因的典型特征,并在 C 端存在单子叶植物 *API/SQUA* 基因所特有的 paleoAPI (LPPWML) 结构域 (Vandenbussehe et al., 2003)。

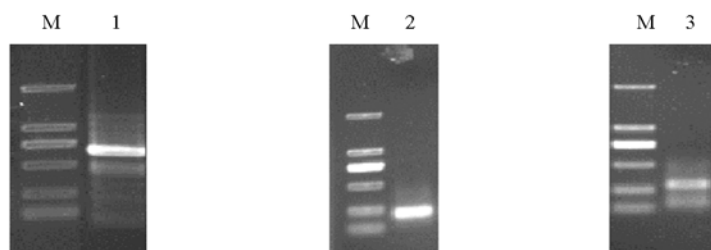


图 1 *CeAPI* 基因的克隆

M: DL2000 marker; 1: 保守区; 2: 3'RACE; 3: 5'RACE。

Fig. 1 Cloning of *CeAPI* gene from *Cymbidium ensifolium*

M: DL2000 marker; 1: Conserved region; 2: 3'RACE; 3: 5'RACE.

萼脊兰 <i>Sedirea japonica</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSAAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	MGRGKVCCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSAAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
华山姜 <i>Alpinia oblongifolia</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSSAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	.....KAHEISVLCDAEVALVTFSTAGKLYBYSTDSOMDRILERY	40
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSAAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
文心兰 <i>Oncidium Gower Ramsey</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSTAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	MGRGRVCLRRINENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSTAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
郁金香 <i>Tulipa gesneriana</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSAAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
建兰 <i>Cymbidium ensifolium</i>	MGRGRVCLKRIENKINQVTFSEKRRSGLIKKAHEISVLCDAEVALVTFSTAGKLYBYSTDSOMDRILERY	70
Consensus	kahe s cd va fs kgkl yt m il ry	
萼脊兰 <i>Sedirea japonica</i>	ERYCYAEKALQITFESQGDICNEYGKLAKSKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	ERYCYAEKALQITFESQGDICNEYGKLAKSKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
华山姜 <i>Alpinia oblongifolia</i>	ERYCYAEKALISSLDCCDENWHEYGKLAKMEATSSQRHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	ERYCYAEKALQNTFESQGDICNEYGKLAKSKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	110
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	ERYCYAEKALQKGTESQGSWLEBYGKLAKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
文心兰 <i>Oncidium Gower Ramsey</i>	ERYCYAEKALQTAEPESHGDCIEYGKLAKSKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	ERYCYAEKALISSCPQLQGNWHEYGKLAKMEATSSQRHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
郁金香 <i>Tulipa gesneriana</i>	ERYCYAEKALQKGTESQGSWLEBYGKLAKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
建兰 <i>Cymbidium ensifolium</i>	ERYCYAEKALQNTFESQGDICNEYGKLAKSKIEALQSRSHLMQEQDLSIKELCHIEQOLETAKHHR	140
Consensus	e y ae a e lk k lk lmg l ke q l ql l hir	
萼脊兰 <i>Sedirea japonica</i>	SQRITLLINSITPEERKESLIEHNSILBAKLCSFCLDSQITEIPTQNP...NWKQOF...QDFEISS	202
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	TQRITLLINCTPEERKESLIEHNSILBAKLCSFCLDPQITETATQNP...NRKQOF...QDCVNSS	202
华山姜 <i>Alpinia oblongifolia</i>	SRKNVILDSISPEVKEKALQKNSLEKQ...ILEKQKAKALTC...QPHWEQA...QISSSS	196
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	SQRITLLINSIAPPEERKESLIEHNSILBAK...ITENESTTA...MTQILNPKQDQACSSS	168
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	SRKNVILDSITPEERKESLIEHNSILBAK...L.QEHKAKALTCWEE...QOQGC...PHISTCL	197
文心兰 <i>Oncidium Gower Ramsey</i>	AQRITLLINSIAPPEERKESLIEHNSILBAK...ITENELTTN...WKQORC...PAQESSS	193
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	TRKCOLNFESISPEERKESLIEHNSILBAK...LMEKQKVALN...QPPWEQGF...QCTSSSS	199
郁金香 <i>Tulipa gesneriana</i>	TRKNVILDSITPEERKESLIEHNSILBAK...L.EEQKSKASACWQEQQOQOQGC...PHANNCS	203
建兰 <i>Cymbidium ensifolium</i>	SQRITLLINSIAPPEERKESLIEHNSILBAK...ITENGLATK...WKQORC...QDCSSS	193
Consensus	q e q ke l e n le	
萼脊兰 <i>Sedirea japonica</i>	ESPFLLQNHLEPTNLGTPTSIGG...E..PE...EFTLLQMNISLPPWMIKST	250
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	ESPFLLPNHLEPTNLGTPTPASIGE...E..PE...EFTLLQMNISLPPWMIKST	250
华山姜 <i>Alpinia oblongifolia</i>	EP..FILADANPTNLGQYQGRPTIEGVEA...VEGQARINNSLPPWMIKSHLN	246
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	EPFPL...NDIPTNLGTPTVPSHGE...E..VA...EFTLLQMNISLPPWMIKSLT	214
麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i>	ESFLLFVEHLEPTNLGQYQGRPTIEGVEA...E..AEACPMQTDNKLPPWMIKSRVN	249
文心兰 <i>Oncidium Gower Ramsey</i>	ESFLLTFTNCLPTNLGTPTVPSHGE...E..PA...QFALTWMNNSLPPWMIKSRVN	242
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	ESFLLIGSLPTNLGQYQGRPTIEGVEA...E..AQPQVRIKNSLPPWMIKSHLN	249
郁金香 <i>Tulipa gesneriana</i>	ESFLLSALPPTNLGQYQGRPTIEGVEA...E..IGATAQACPLARPGSNKLPPWMIKSHVN	257
建兰 <i>Cymbidium ensifolium</i>	EPFLLPINDLEPTNLGTPTVPSHGE...E..VA...EFTLLQMNISLPPWMIKSRST	241
Consensus	p lppwml	

图 2 *CeAPI* 编码的氨基酸序列与其他物种 *API/SQUA* 蛋白的序列比较

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequence of *CeAPI* with other *API/SQUA* proteins

为了分析 *CeAPI* 基因与其他植物 *API/SQUA* 基因的系统进化关系, 采用 MEGA 5.0 软件构建了系统进化树, 结果如图 3 所示。所有的单子叶植物归为一类, 双子叶植物可以明显的分为两大类。*CeAPI* 与球花石斛的 *DthyFL2* 聚在一起, 而且兰科植物的 *API* 大多数都聚在一起, 说明兰科植物 *API* 的相似度较高, 这预示着它们的功能具有一定的相似性。

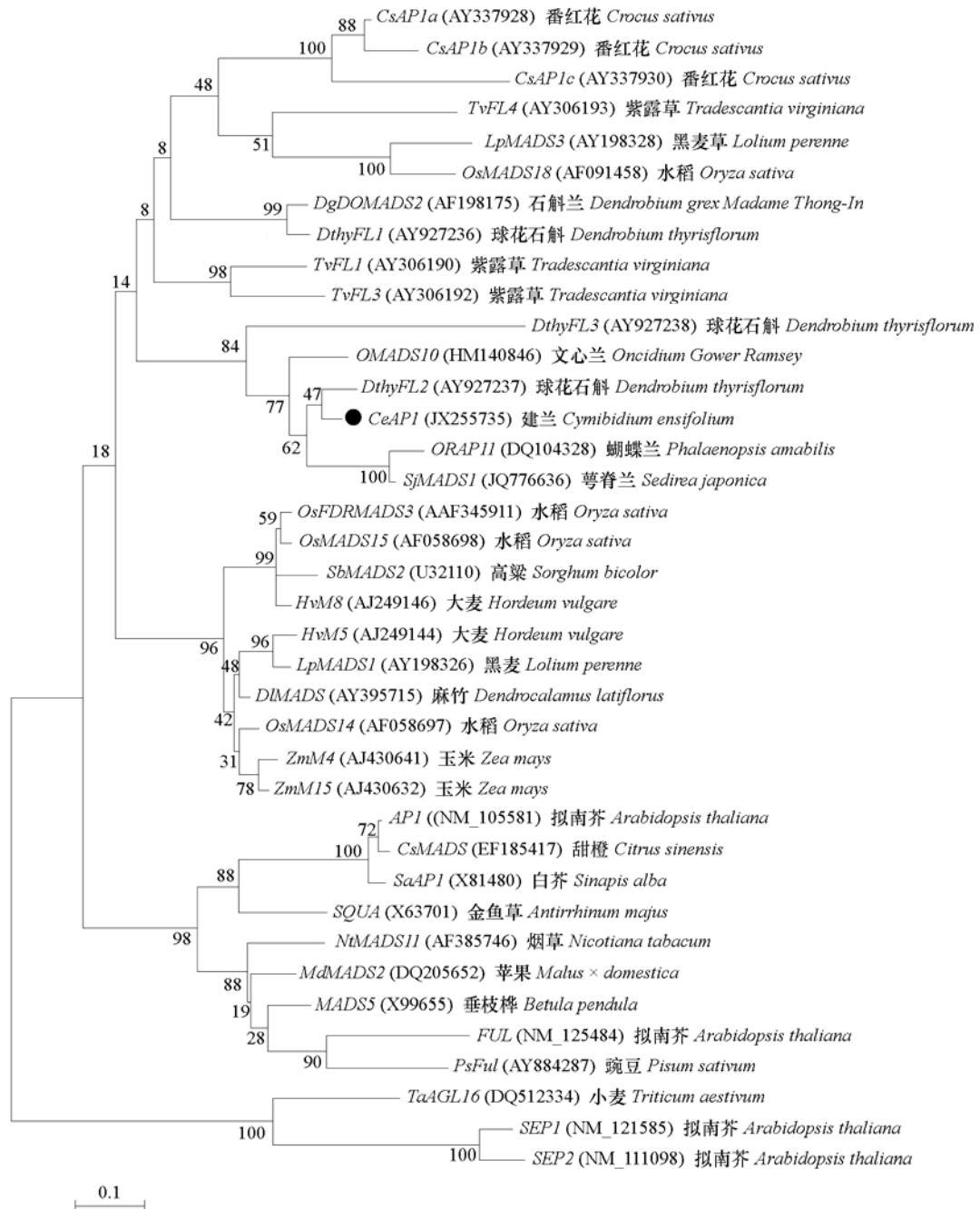


图 3 *CeAPI* 基因编码蛋白的系统进化树分析

自展值 (1 ~ 1 000) 标记各个节点。

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of proteins encoded by *CeAPI* genes

Boot-strap values from 1 000 - replicates are indicated at each node.

### 2.3 *API* 在建兰不同发育时期和不同组织的表达分析

为了解 *CeAPI* 的功能, 利用荧光定量 PCR 方法检测了其在建兰不同器官和不同发育阶段的表达情况, 结果如图 4 所示。在花发育初期 (< 0.5 cm 花芽) *CeAPI* 高水平表达, 以后各发育阶段都较低, 衰败时期最低。同时也检测了盛开花的各组织和各营养器官的表达情况, *CeAPI* 在根、叶和花梗等营养器官中表达水平较高, 尤其在花梗中的表达水平最高; 在成熟的花器官中只有在合蕊柱中表达, 其他花组织中几乎不表达。

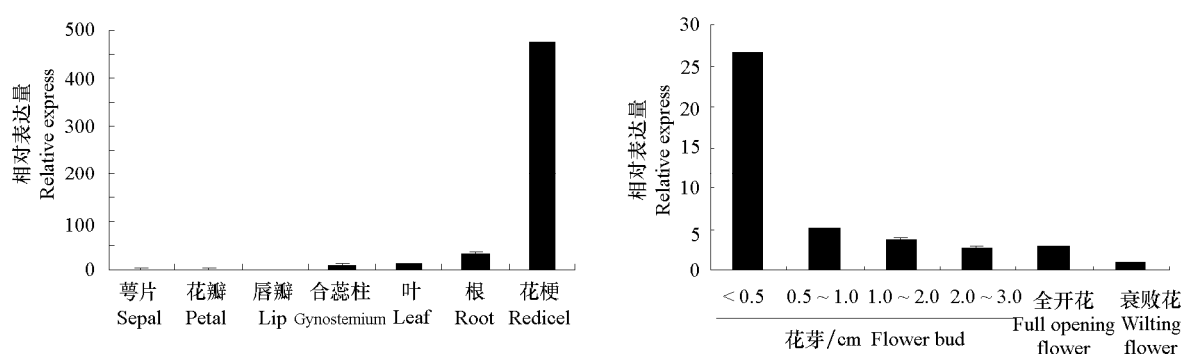


图 4 *CeAPI* 基因的表达分析  
Fig. 4 Expression analysis of *CeAPI*

### 2.4 建兰 *API* 与其它 MADS-box 转录因子相互作用的分析

为了分析建兰各类 MADS-box 转录因子间的互相作用, 将构建好的 AD-*CeAPI* 质粒分别与 BD-*CeAPI*、BD-*CeAP31*、BD-*CeAP32*、BD-*CePI1*、BD-*CeAG1*、BD-*CeSTK*、BD-*CeSEP3* 和 BD-*CeAGL6* 相应地共转化到酵母 AH109 菌种中。试验结果表明: 共转化的酵母菌株能在二缺培养基中正常生长, 除 *CeAPI* 和 *CeAG* 质粒共转化的酵母菌种不能在四缺培养基中正常生长外, 其它共转化的酵母菌株都能在四缺培养基中正常生长, 且 X-gal 显色检验都呈蓝色 (图 5), 这说明 *CeAPI* 能形成同源二聚体, 同时 *CeAPI* 也能与 B 类、D 类和 E 类 MADS-box 转录因子相互作用, 但不能与 C 类 MADS-box 转录因子 *CeAG* 相互作用。

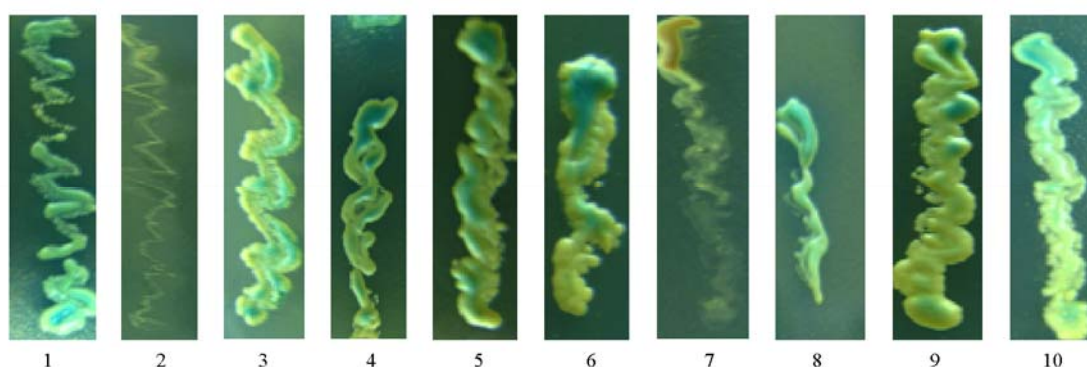


图 5 酵母共转化子在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基的生长情况

1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: *CeAPI* 和 *CeAPI*; 4: *CeAPI* 和 *CeAP31*; 5: *CeAPI* 和 *CeAP32*; 6: *CeAPI* 和 *CePI1*; 7: *CeAPI* 和 *CeAG1*; 8: *CeAPI* 和 *CeSTK*; 9: *CeAPI* 和 *CeSEP3*; 10: *CeAPI* 和 *CeAGL6*。

Fig. 5 Selective dropout medium lacking Leu, Trp, His and Ade supplemented

1: Positive control; 2: Negative control; 3: *CeAPI* and *CeAPI*; 4: *CeAPI* and *CeAP31*; 5: *CeAPI* and *CeAP32*; 6: *CeAPI* and *CePI1*; 7: *CeAPI* and *CeAG1*; 8: *CeAPI* and *CeSTK*; 9: *CeAPI* and *CeSEP3*; 10: *CeAPI* and *CeAGL6*.

### 3 讨论

*API/SQUA* 亚族的 *API* 及其同源基因已从多种植物中克隆获得, 但对它们的确切功能还不是十分清楚。为了研究 *API/SQUA* 基因在建兰中的作用, 本试验中通过 RACE 技术克隆了 *CeAPI*。氨基酸序列比对结果显示它和大多数兰花的 *API/SQUA* 亚族基因的蛋白相似, *CeAPI* 的 C 末端有一个保守的 *paleoAP1* 结构域 (LPPWML), 系统进化分析表明, *CeAPI* 基因属于 *API/SQUA* 亚族单子叶植物的 *SQUA* 分化枝, 且和其它兰花的相似度较高。这些结果均表明, *CeAPI* 基因属于 *MADS-box* 基因家族中的 *API/SQUA* 亚族成员。

Litt 和 Irish (2003) 研究了 *API/SQUA* 亚族 *MADS-box* 基因的系统进化, 指出在核心双子叶植物内有 *euAPI* 和 *euFUL* 两个分化枝, 在单子叶植物中只有一个类似于 *euFUL* 的分化枝 *FUL-like*。*euAPI* 进化枝在非核心双子叶植物和单子叶植物内缺乏其同源基因, 这表明控制这两类植物花发育的机制可能与核心双子叶植物存在一定的差异。系统发育分析表明, 所有单子叶植物基因属于同一分化枝, 这也表明在单子叶植物的祖先中只有一个 *FUL-like* 基因存在。同时系统发育分析结果还表明在单子叶植物中至少发生了两个主要重复事件: 一个发生在禾本科分化之前和另一个发生在禾本科内。兰科植物的 *API/SQUA* 亚族应该在树兰亚科分化前就发生了基因重复。

大多数 *API/SQUA* 亚族基因在植物的早期分生组织和花原基中表达, 如典型的 *API/SQUA* 亚族基因 *SQUA* 和 *API*。本试验的 *CeAPI* 基因在建兰花发育初期高水平表达, 在以后各阶段表达水平都较低, 这与 *API* 是花分生组织特性决定基因的功能相吻合。*CeAPI* 只在营养器官和成熟花的合蕊柱中表达, 这表明建兰的 *API/SQUA* 亚族基因 *CeAPI* 与外两轮花器官的发育关系不大。*API/SQUA* 亚族基因在盛开花中的表达模式有一定的差异。正常的 *SQUA* 和 *API* 只存在于成熟花的萼片和花瓣中 (Huijser et al., 1992; Mandel et al., 1992; Kempin et al., 1995)。*DOMADS2* 只在合蕊柱和胚珠中表达 (Yu & Goh, 2000), 烟草的 *NtMADS11* 在萼片、心皮和花瓣中表达 (Yan et al., 2000), *MdMADS2* 在成熟花 4 轮花器官中都表达 (Sung et al., 1999)。有趣的是, 单子叶植物水稻的 *OsMADS18*、百合的 *LMADS5/6*、石斛兰的 *DthyrFL2* 和文心兰 *OMADS10* 与 *CeAPI* 一样, 都在营养器官中表达 (Masiero et al., 2002; Fornara et al., 2004; Martin et al., 2005; Chen et al., 2008; Chang et al., 2009), 这可能意味着某一类 *API* 基因在单子叶植物中功能保守。

*MADS-box* 蛋白间的相互作用对于正确行使它们的功能是必需的 (Pelaz et al., 2001; Theißen & Saedler, 2001), 所以通过酵母双杂交的方法来验证 *CeAPI* 与建兰其他 *MADS-box* 蛋白间的相互作用。试验结果显示除了 *CeAG1* 不能与 *CeAPI* 相互作用, 其他的 *MADS-box* 转录因子都能与 *CeAPI* 相互作用。在建兰中有两个 C 类 *MADS-box* 基因 *CeMADS1* 和 *CeMADS2*, 而且 Wang 等 (2011) 认为 *CeMADS1* 在建兰生殖器官的发育中起着主要作用。本试验分离的 *CeAG1* 与 *CeMADS2* 具有极高的相似性, 应该是同一个基因。*API/SQUA* 亚族基因在单子叶植物中大都存在基因重复的现象, 如在玉米中至少有 5 个 (Fischer et al., 1995; Mena et al., 1995), 水稻中有 3 到 4 个 (Kyoizuka et al., 2000), 石斛兰中有 3 个 (Martin et al., 2005)。同时 *API/SQUA* 亚族基因具有花器官和花分生组织特性决定两方面的功能。因此, 本试验中分离的 *CeAPI* 基因应该是花分生组织特性决定基因, 在建兰中应该还有其它行使花器官决定的 *API/SQUA* 亚族基因存在。

### References

- Becker A, Theißen G. 2003. The major clades of *MADS-box* genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 29: 464 - 489.
- Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz E M. 1993. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting

- genes. *Development*, 119: 721 – 743.
- Chang Y Y, Chiu Y F, Wu J W, Yang C H. 2009. Four orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *API/AGL9-like MADS box* genes show novel expression patterns and cause different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 50: 1425 – 1438.
- Chen M K, Lin I C, Yang C H. 2008. Functional analysis of three lily (*Lilium longiflorum*) *APETALA1-like MADS box* genes in regulating floral transition and formation. *Plant Cell Physiol*, 49: 704 – 717.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 – 37.
- Fischer A, Baum N, Saedler H, Theißen G. 1995. Chromosomal mapping of the MADS-box multigene family in *Zea mays* reveals dispersed distribution of allelic genes as well as transposed copies. *Nucleic Acids Res*, 23: 1901 – 1911.
- Fornara F, Parenicova L, Falasca G, Pelucchi N, Masiero S, Ciannamea S. 2004. Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the *API/SQUA* subfamily of *MADS box* genes. *Plant Physiol*, 135: 2207 – 2219.
- Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky M F. 1994. Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell*, 76: 131 – 143.
- Hsu H F, Huang C H, Chou L H, Yang C H. 2003. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *AGL6-like* gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 44: 783 – 794.
- Huijser P, Klein J, Lonnig W, Meijer H, Saedler H, Sommer H. 1992. Bracteomania, an in florescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J*, 11: 1239 – 1249.
- Kempin S A, Savidge B, Yanofsky M F. 1995. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*, 267: 522 – 525.
- Kyozuka J, Harcourt R, Peacock W J, Dennis E S. 1997. Eucalyptus has functional equivalents of the *Arabidopsis API* gene. *Plant Mol Biol*, 35: 573 – 584.
- Kyozuka J, Kobayashi T, Morita M, Shimamoto K. 2000. Spatially and temporally regulated expression of rice MADS box genes with similarity to *Arabidopsis* class A, B and C genes. *Plant Cell Physiol*, 41: 710 – 718.
- Litt A, Irish V F. 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics*, 165: 821 – 833.
- 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.
- Mandel M A, Yanofsky M F. 1995. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 377: 522 – 524.
- Martin S, Kim B P, Louise B J, Signe F, Vivian F I, Bo B J. 2005. Identification and quantification of expression levels of three *FRUITFULL-like MADS-box* genes from the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.). *Plant Science*, 169: 579 – 586.
- Masiero S, Imbriano C, Ravasio F, Favaro R, Pelucchi N, Gorla M S. 2002. Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *J Biol Chem*, 277: 26429 – 26435.
- Mena M, Mandel M A, Lerner D R, Yanofsky M F, Schmidt R J. 1995. A characterization of the MADS-box gene family in maize. *Plant J*, 8: 845 – 854.
- Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohalmi A E, Crosby W L, Yanofsky M F. 2001. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J*, 26: 385 – 394.
- Sung S K, Yu G H, An G. 1999. Characterization of *MdMADS2*, a member of the *SQUAMOSA* subfamily of genes, in apple. *Plant Physiol*, 120: 969 – 978.
- Theißen G. 2001. Development of floral organ identity, stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 75 – 85.
- Theißen G, Saedler H. 2001. Plant biology. Floral quartets. *Nature*, 409: 469 – 471.
- 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 Res*, 31: 4401 – 4409.
- Wang S Y, Lee P F, Lee Y, Hsiao Y Y, Chen Y Y, Pan Z J, Liu Z J, Tsai W C. 2011. Duplicated C-class MADS-box genes reveal distinct roles in gynostemium development in *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae). *Plant Cell Physiol*, 52: 563 – 577.
- Yan H, Li Q, Zhang J S, Zheng Z, Xue S, Li Y. 2000. Molecular cloning and characterization of two tobacco MADS-box genes. *Sex Plant Reprod*, 13: 163 – 169.
- Yu H, Goh C J. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the *API/AGL9* subfamily during floral transition. *Plant Physiol*, 123: 1325 – 1336.