

开花负调因子芥菜 BjSVP 与甘蓝 BoFLC 的异源互作研究

汤青林*, 刘智宇, 杨朴丽, 宋 明*, 王志敏

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为阐明开花负调因子 BjSVP (源于种子春化型作物芥菜) 与 BoFLC (源于绿体春化作物甘蓝) 异源聚合后在开花调控路径中的互作机制, 从芥菜酵母重组质粒 pGADT7-BjSVP 分别亚克隆含 MI、MIK、K、IKC、KC、IK、IK₁L₁K₂L₂、IK₁L₁K₂、IK₁L₁、IK₁、I 结构域的 11 个 SVP 截短体(BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11), 构建猎物质粒 pGADT7-BjSVPΔ1 ~ pGADT7-BjSVPΔ11 并转化酵母 Y187 菌; 从甘蓝中克隆了 BoFLC 和 BoFLCzq 基因, 构建诱饵质粒 pGBKT7-BoFLC、pGBKT7-BoFLCzq 并转化酵母 Y2HGold 菌。酵母双杂交表明: 芥菜 BjSVP 能与甘蓝 BoFLC 相互作用, 在 QDO/X/A 培养基上长出蓝色菌落, 激活酵母报告基因 AUR1-C、HIS3、ADE2、MEL1。截短体 BjSVPΔ2 ~ BjSVPΔ5 也能与 BoFLC 相互作用, 而 BjSVPΔ7 ~ BjSVPΔ11 不能与 BoFLC 互作。由此表明 BjSVP 完整的 K 域(BjSVP3)可独立作用于 BoFLC, 但 K 域亚域(K1、K2、K3)或者连接区(L1、L2)缺失突变后不能介导该作用。作用强度分析表明: BjSVP 的 I 域能增强该蛋白互作, 但 M 域和 C 域可能会干扰该作用; 芥菜 BjFLC 被甘蓝 BoFLC 或 BoFLCzq 替换后, 可明显增加作用强度; 甘蓝 FLC 的 I 域第 20 位、K 域第 65 位和 C 域第 32 位氨基酸的变异很可能与作用强度相关。

关键词: 芥菜; 甘蓝; FLC; SVP; 截短体; 酵母双杂交

中图分类号: S 635.1; S 637.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2013) 12-2441-12

Identification of Protein Interactions Between BjSVP from *Brassica juncea* and BoFLC from *Brassica oleracea*

TANG Qing-lin*, LIU Zhi-yu, YANG Pu-li, SONG Ming*, and WANG Zhi-min

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University; Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education; Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China)

Abstract: The transcription factors Flowering Locus C (FLC) and SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) regulate the flowering time via protein interactions in the homologous plants of *Brassica juncea* or *Brassica oleracea*, respectively. However, the heterologous protein-protein interactions between BoFLC of *Brassica oleracea* and BjSVP of *Brassica juncea* have not been thoroughly understood. In an effort to unravel the mechanisms involved in the heterologous interactions, we cloned BjSVPΔ1 - BjSVPΔ11 (MI, MIK, K, IKC, KC, IK, IK₁L₁K₂L₂, IK₁L₁K₂, IK₁L₁, IK₁ or I domains) in *Brassica juncea*, BoFLC

收稿日期: 2013-10-10; 修回日期: 2013-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000908); 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB113900); 重庆市自然科学基金项目(2011BA1002); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2012B020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: swutql@163.com; swausongm@163.com)

and *BoFLCzq* in *Brassica oleracea*, respectively. Then we tested the interactions between *BoFLC* and *BjSVP*, using the Gal4 yeast two-hybrid system and the β -galactosidase activity assay. Results showed that *BjSVP* or *BjSVP* Δ 2 - *BjSVP* Δ 5 interact with *BoFLC*. And the fused strains were incubated on QDO/X- α -Gal/AbA plate and blue colonies were found, suggesting that the yeast fusion reporter genes *HIS3*, *AURI-C*, *ADE2*, and *MEL1* were activated. It also indicated that the full length of K domain (*BjSVP* Δ 3) was the key amino acid region to independently mediate the protein interactions. However, *BjSVP* Δ 7 - *BjSVP* Δ 11 truncated forms without K1, K2, K3, L1 or L2 in K domain failed to act with *BoFLC*. Furthermore, the heterologous interaction was enhanced by I domain of *BjSVP*, but weakened by its M domain and C domain. The interaction also enhanced by *BoFLC* or *BoFLCzq*, compared with the interaction of *BjFLC* protein. The three amino acid variations (site 20 of I domain, site 65 of K domain and site 32 of C domain) were probably related to the protein interaction strength.

Key words: *Brassica juncea*; *Brassica oleracea*; FLC; SVP; truncated forms; yeast two-hybrid system

开花调控基因 *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) 广泛存在于多种植物中, 例如拟南芥 *AtSVP* (Li et al., 2008)、大白菜 *BrSVP* (Lee et al., 2007)、枳 *PtSVP* (Li et al., 2010)、芥菜 *BjSVP* (汤青林 等, 2011)。*SVP* 基因编码蛋白含 M、I、K 和 C 域。M 域和 K 域保守性较强, I 域和 C 域保守性稍弱 (Martínez-Castilla & Alvarez-Buylla, 2003)。Cho 等 (2012) 发现拟南芥中成熟 miR172 和 pri-miR172a 的水平与 *SVP* 活性呈负相关, EMSA 和 ChIP 分析表明 *SVP* 与 miR172a 启动子的 CArG 基序结合, 负调控 miR172 的转录, 从而调节开花。更为重要的是, *SVP* 能与在春化响应中发挥核心作用的 FLC 互作 (Hartmann et al., 2000; Li et al., 2008), 形成 *SVP*-*FLC* 复合物, 并结合到开花整合子 *FT* 和 *SOC1* 的 CArG 基序, 调节它们的表达 (Lee et al., 2007; Li et al., 2008), 延迟开花。*SVP* 功能缺失能显著抑制 *FLC* 高表达的 *FRI FLC* 植株的晚花表型 (Michaels & Amasino, 1999), 而 *FLC* 功能缺失可以适度恢复 35S::*SVP* 的晚花型, 表明 *FLC* 和 *SVP* 功能是相互依存的。利用 GST 融合技术、酵母双杂交和免疫共沉淀法证实了拟南芥 *AtSVP* 与 *AtFLC* 在体内外均存在相互作用 (Fujiwara et al., 2008; Li et al., 2008; Jung & Müller, 2009), 形成一个开花阻遏复合物, 共同介导环境信号 (Li et al., 2008)。此外, 汤青林等 (2011, 2012) 利用 pET 原核表达系统和酵母真核表达系统证实了种子春化作物芥菜 *BjSVP* 蛋白与 *BjFLC* 蛋白能互作。杨朴丽等 (2013) 也证实了绿体春化作物甘蓝 *BoSVP* 与 *BoFLC* 能发生相互作用。

但是, 前人的研究主要集中在同源植物 *SVP* 与 *FLC* 的相互作用上, 对源于不同作物的 *SVP* 与 *FLC* 之间的蛋白互作还未见报道。目前, 已有通过转基因技术导入异源植物 *FLC* 的研究, 例如, 来源于拟南芥的 *AtFLC* 在烟草中表达时, 可比对照延迟开花约 14 d (Hassan et al., 2005); 而来源于甘蓝的 *BoFLC* 在芥菜中表达时, 可延迟开花约 9 d (杨海鹏 等, 2013)。可见表达异源植物的 *FLC* 能够在一定程度上延迟开花时间。但是开花负调因子 *FLC* 往往并不是自身单独作用于下游元件, 而是与其他调控因子结合, 最具典型代表性的是 *FLC* 能够与另一个核心负调因子 *SVP* 结合成蛋白复合物, 从而延迟开花时间 (Lee et al., 2007; Li et al., 2008)。那么, 利用转基因技术将异源植物 *FLC* 导入后, 能否与内源 *SVP* 蛋白互作, 其作用的分子行为如何, 对开花时间分子调控有怎样的影响, 目前还未见相关报道。本试验中利用酵母双杂交系统研究了绿体春化作物甘蓝 *FLC* 与种子春化作物芥菜 *SVP* 异源蛋白互作机制, 为进一步对异源植物 *FLC* 和内源 *SVP* 在转基因分子聚合后的体内蛋白互作机制、作用氨基酸位点等研究奠定基础。这也将有利于构建春化核心调控基因 *FLC* 的转基因突变体, 改变 *FLC* 在不同春化型作物间的蛋白作用模式, 调节 *FLC* 与 *SVP* 异源互作强度和对

春化作用的敏感性,从而延迟或促进开花时间。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2013 年 2 月至 8 月在重庆市蔬菜学重点实验室完成。甘蓝材料 ‘HM’ 和 ‘ZQ’ 分别为 ‘黄苗’ 和 ‘早秋’ 母本系,芥菜材料 ‘QJ’ 为 ‘青叶大头芥’ 自交系。质粒 pGADT7-BjSVP 和 pGBKT7-BjFLC 均由本实验室提供。酵母双杂交系统及各种酵母缺陷型培养基均购自 Clontech 公司。EcoR I、BamH I 和 Pst I 购自 TaKaRa 公司。DNA 回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。高保真 DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司。

1.2 BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11} 与 BoFLC 基因克隆及酵母表达载体构建

根据 MIKC 蛋白结构域特性分别设计了甘蓝 FLC、芥菜 SVP 及其截短体的引物(表 1)。以芥菜 pGADT7-BjSVP 质粒为模板,采用 Platinum pfx DNA polymerase 高保真聚合酶,以 SVP 基因相应的引物组合(表 2)分别亚克隆 BjSVP_{A1}、BjSVP_{A2}、BjSVP_{A3}、BjSVP_{A4}、BjSVP_{A5}、BjSVP_{A6}、BjSVP_{A7}、BjSVP_{A8}、BjSVP_{A9}、BjSVP_{A10}、BjSVP_{A11} 截短体(以下简称为 BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11})。以 FF(E)1/FR(Ps)为引物(表 2),从甘蓝材料 ‘HM’ 克隆 FLC 基因 BoFLC。

表 1 BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11} 与 BoFLC 的 PCR 引物
Table 1 Primers used for amplification of the BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11} and BoFLC

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
S(E)	CCGGAATTCCTTCGTTGTGATGGCGAGAGAAAAGA	S(B)-3	CGCGGATCCCTTTTCACTCTTTGTTTCAATTACG
S(E)-3	CCGGAATTCGATCACGCCCTGTGAGCAAAGAGA	S(B)-4	CGCGGATCCATTACGCGAGTCAAACCGGATTCAA
S(E)-4	CCGGAATTCCTCCAGCATGAGGGAAGTGTTAGAGA	S(B)-5	CGCGGATCCCAATGTAAAGTCCTTGAAGTTCCTC
S(B)	CGCGGATCCATCTCTAACCACCATAACGTAAGCC	S(B)-6	CGCGGATCCATTTGCCTTAATCGGTGGCTCTTTT
S(B)-1	CGCGGATCCTGTTCTCGACTAGCTGTAACCTCAAG	FF(E)1	CCGGAATTCACAGAAGCCATGGGAAGAAAAAAC
S(B)-2	CGCGGATCCTTGCTGCCTTAGCCGCTTGTTCTCA	FR(Ps)	TGCACCTGCAGGTGGCTAATWAAGCAGTSGGAGMGT

注:下划线为 EcoR I、BamH I 或 Pst I 酶切位点。

Note: Restriction enzymes of EcoR I, BamH I or Pst I used for cloning are underlined.

表 2 BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11} 和 BoFLC 引物组合及其编码蛋白结构域
Table 2 Protein domains and the primers pairs used for amplification of BjSVP_{A1} ~ BjSVP_{A11} and BoFLC

基因名称 Gene name	引物组合 Primers used for PCR	编码氨基酸数 Number of amino acid	编码蛋白的结构域 Protein domains
BjSVP	S(E) / S(B)	241	MIKC*
BjSVP _{A1}	S(E) / S(B)-1	95	MI*
BjSVP _{A2}	S(E) / S(B)-2	173	MIK*
BjSVP _{A3}	S(E)-3 / S(B)-2	78	K*
BjSVP _{A4}	S(E)-4 / S(B)	179	IKC*
BjSVP _{A5}	S(E)-3 / S(B)	146	KC*
BjSVP _{A6}	S(E)-4 / S(B)-2	111	IK*
BjSVP _{A7}	S(E)-4 / S(B)-3	86	IK ₁ L ₁ K ₂ L ₂
BjSVP _{A8}	S(E)-4 / S(B)-4	80	IK ₁ L ₁ K ₂
BjSVP _{A9}	S(E)-4 / S(B)-5	64	IK ₁ L ₁
BjSVP _{A10}	S(E)-4 / S(B)-6	52	IK ₁
BjSVP _{A11}	S(E)-4 / S(B)-1	33	I
BoFLC	FF(E)1/ FR(Ps)	197	MIKC*

*: 汤青林 等, 2012。

以 OMEGA 公司质粒提取试剂盒分别提取芥菜 *BjSVPΔ1* ~ *BjSVPΔ11* 目的基因质粒以及酵母表达质粒 pGADT7, 并经 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后, 高效连接酶 16 °C 连接 30 min, 构建酵母猎物质粒 pGADT7-*BjSVPΔ1* ~ pGADT7-*BjSVPΔ11*。甘蓝 BoFLC 经 *EcoR* I / *Pst* I 双酶切后与 pGBKT7 融合, 构建诱饵质粒 pGBKT7-BoFLC。将通用引物 T7/3'AD 和 T7/3'BD 分别鉴定为阳性的质粒双向测序。

1.3 酵母转化子的获得以及毒性与自激活检测

参考 Clontech 公司 Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册和汤青林等 (2012) 方法, 从 YPDA 固体培养基上挑选酵母 Y2HGold 和 Y187 直径为 2 ~ 3 mm 的单菌落, 分别制备酵母感受态细胞。取 100 ng 待转化的重组质粒 pGADT7-*BjSVPΔ1* ~ pGADT7-*BjSVPΔ11*、pGBKT7-BoFLC, 采用 PEG/LiAc 法分别转化到 50 μL 的 Y187 和 Y2HGold 感受态细胞, 获得酵母转化子 Y187[pGADT7-*BjSVPΔ1*] ~ Y187[pGADT7-*BjSVPΔ11*]、Y2HGold[pGBKT7-BoFLC], 并分别涂于 SD/-Leu、SD/-Trp 固体培养基上, 同时分别以空载体转化子 Y187[pGADT7]、Y2HGold[pGBKT7] 为对照, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d, 通过观察菌落生长情况判断是否存在毒性。

将酵母转化子 Y187[pGADT7-*BjSVPΔ1*] ~ Y187[pGADT7-*BjSVPΔ11*] 分别涂于 SD/-Leu、SD/-Leu/X-α-Gal、SD/-Leu/-Trp (以下简称 DDO) 和 SD/-Leu/X-α-Gal/AbA 平板上; 将酵母转化子 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC] 分别铺于 SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal、DDO 和 SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 平板上; 30 °C 培养 3 ~ 5 d, 观察上述酵母转化子在选择平板上的生长情况。同时设立 Y2HGold[pGBKT7-Lam] × Y187[pGADT7-T] (阴性对照) 和 Y2HGold[pGBKT7-53] × Y187[pGADT7-T] (阳性对照), 判断是否存在自激活现象。

1.4 BjSVP 与 BoFLC 全长之间的互作检测

分别挑取 SD/-Leu、SD/-Trp 平板上的菌落, 将含有 *BjSVP* 全长的转化菌落 Y187[pGADT7-*BjSVP*] 与 BoFLC 全长的 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC] 转化菌落两两融合后, 分别涂布于 DDO、SD/-Trp/-Leu/AbA (以下简称 DDO/AbA) 平板, 30 °C 培养 3 ~ 5 d 后将 DDO/AbA 平板上的克隆菌株划线至 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His (以下简称 QDO) 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X-α-Gal/AbA (以下简称 QDO/X-α-Gal/AbA) 平板, 同时设阳性和阴性对照, 观察菌落生长情况, 检测 *BjSVP* 与 BoFLC 之间的相互作用, 将 *BjSVP* 与 BoFLC 蛋白的酵母载体互换后再次验证其相互作用。

1.5 BjSVP 蛋白作用域及其亚域的筛选

将含有 BoFLC 全长的 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC] 转化菌落与含有不同结构域的 Y187[pGADT7-*BjSVPΔ1*] ~ Y187[pGADT7-*BjSVPΔ5*] 转化菌落两两融合后, 分别涂布于 DDO、DDO/AbA 平板, 30 °C 培养 3 ~ 5 d 后将 DDO/AbA 平板上的克隆菌株划线至 QDO 和 QDO/X-α-Gal/AbA 平板, 筛选介导 *BjSVP* 蛋白作用于 BoFLC 的结构域。

分别选取 K 域亚域 (K1、K2、K3) 或者亚域间的连接区 (L1、L2) 缺失突变的转化子 Y187[pGADT7-*BjSVPΔ6*] ~ Y187[pGADT7-*BjSVPΔ11*], 与 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC] 于 500 μL 2×YPDA 中混匀, 30 °C 培养 20 ~ 24 h, 取适量涂于 SD/-Leu、SD/-Trp、DDO、DDO/AbA、QDO 和 QDO/X-α-Gal/AbA 固体平板, 30 °C 培养, 筛选相互作用的亚域。

1.6 β-半乳糖苷酶活性测定

为了分析作用强度与 FLC 蛋白及其结构域之间的关系, 本试验还将甘蓝材料 'ZQ' 的 *FLC* 基因 (记作 *BoFLCzq*) 构建到 pGBKT7 酵母载体, 并与 *BjSVP* 酵母双杂交, 其结果与 BoFLC × *BjSVP* 类似 (数据未列出)。将 BoFLC、BoFLCzq、*BjFLC* 分别与 *BjSVP*、*BjSVPΔ2*、*BjSVPΔ3*、*BjSVPΔ4*、

BjSVPΔ5、BjSVPΔ6 酵母双杂交后,以 Thermo 公司 Yeast β-Galactosidase Assay Kit 试剂盒测定融合菌的 OD₆₆₀ 值和 A₄₂₀ 吸光值,计算酵母 β-半乳糖苷酶活性(汤青林等,2013)。

β -半乳糖苷酶活性 = $(1\,000 \times A_{420}) / (t \times V \times OD_{660})$ 。t 为反应时间(min),V 为用作检测活性的菌悬液体积(mL),活性单位表示为 Miller Units(郜尽等,2009)。

2 结果与分析

2.1 BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11 截短体与 BoFLC 基因的克隆及其酵母融合载体构建

从芥菜酵母重组质粒 pGADT7-BjSVP 中亚克隆了 11 个 BjSVP 截短体 BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11 (图 1),分别编码 95、173、78、179、146、111、86、80、64、52 和 33 个氨基酸,且分别含有 MI、MIK、K、IKC、KC、IK、IK₁L₁K₂L₂、IK₁L₁K₂、IK₁L₁、IK₁ 和 I 域。

从甘蓝亲本‘HM’中克隆了 BoFLC,为 625 bp (图 1)。与白菜 BrFLC (登录号: DQ866876) 同源性高达 98%,与油菜 BnFLC (登录号: AY036890) 同源性高达 98%,表明确实克隆到了甘蓝 BoFLC 基因,它编码 197 个氨基酸。结构域分析 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 表明: BoFLC 属于 MIKC 型蛋白, M 域位于第 12 ~ 62 位氨基酸之间, K 域位于第 87 ~ 166 位氨基酸之间。信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 表明: BoFLC 蛋白的 N 端不含信号肽,不属于胞外分泌蛋白或膜蛋白。

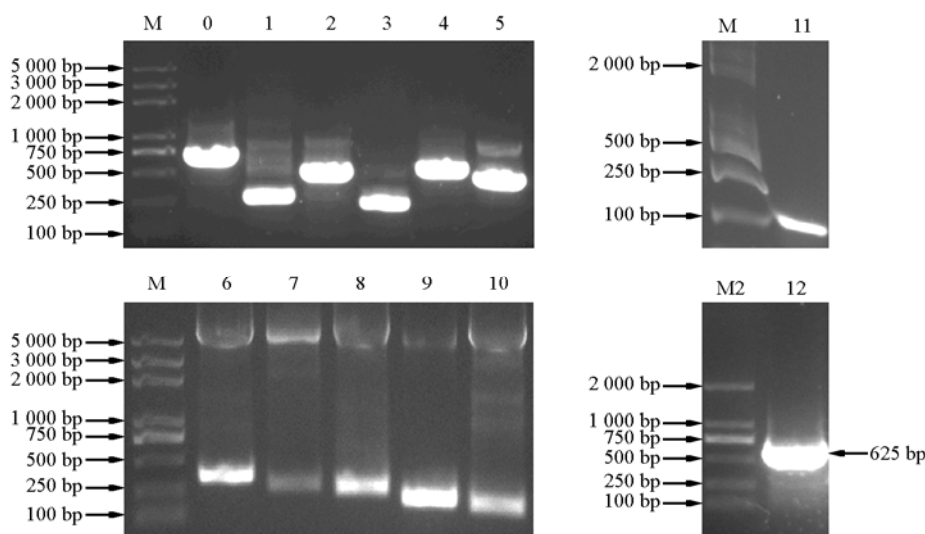


图 1 BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11 截短体和 BoFLC 的 PCR 电泳图

Fig. 1 Analysis the PCR production of BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11 and BoFLC

M: Trans2K plus DNA marker; 0: BjSVP; 1-11: BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11; M2: DL 2000 marker; 12: BoFLC.

BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11 克隆子经 EcoR I /BamH I 双酶切后连接到酵母质粒 pGADT7, 获得猎物质粒 pGADT7-BjSVPΔ1 ~ pGADT7-BjSVPΔ11。BoFLC 克隆子经 EcoR I /Pst I 双酶切后连接到酵母质粒 pGBKT7, 获得诱饵质粒 pGBKT7-BoFLC。经过 PCR 检测、鉴定及上海英骏公司测序表明: 目的片段插入酵母载体的位置与方向均完全正确, 没有发生移码突变。

猎物质粒 pGADT7-BjSVPΔ1 ~ pGADT7-BjSVPΔ11 转化酵母菌 Y187、诱饵质粒 pGBKT7-BoFLC 转化酵母菌 Y2HGold 后, 分别能在 SD/-Leu、SD/-Trp 缺陷型选择性平板上长出白色阳性菌落, 且与对照 Y187[pGADT7]、Y2HGold[pGBKT7]在 30 ℃培养 3 d 的菌落大小相当, 说明上述重组质粒对酵母均无毒性。

酵母转化子 Y187[pGADT7-BjSVPΔ1] ~ Y187[pGADT7-BjSVPΔ11]在 SD/-Leu/X-α-Gal 平板上长出白色菌落, 但在 SD/-Leu/X-a-Gal/AbA 和 DDO 平板上均不能生长。而 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC]在 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上长出白色菌落, 但在 SD/-Trp/X-a-Gal/AbA 和 DDO 上也不生长。说明 BjSVPΔ1 ~ BjSVPΔ11、BoFLC 均不能自激活 *MEL1* 和 *AURI-C* 等报告基因, 无自身转录激活活性。

2.2 BjSVP 全长与 BoFLC 相互作用检测

二倍体酵母融合菌 Y187[pGADT-T] × Y2HGold[pGBKT7-53]、Y187[pGADT-T] × Y2HGold[pGBKT7-Lam]分别为酵母双杂交系统本身的阳性、阴性对照 (表 3 中编号 3 和 4); 而融合菌 Y187[pGADT7-BjSVP] × Y2HGold[pGBKT7]、Y187[pGADT7-BoFLC] × Y2HGold[pGBKT7]、Y187[pGADT7] × Y2HGold[pGBKT7-BjSVP]、Y187[pGADT7] × Y2HGold[pGBKT7-BoFLC]均为自设阴性对照 (表 3 中编号 5、6、7 和 8)。除阳性对照能在 DDO/AbA、QDO、QDO/X-α-Gal/AbA 同时长菌落外, 其余阴性对照均不能在这些选择性培养基生长 (表 3), 表明本酵母双杂系统严谨可靠。酵母转化子 Y187[pGADT7-BjSVP]与 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC]融合后, 涂布在 DDO 上可长出白色菌落, 表明已融合成二倍体酵母菌。将 DDO 平板的融合菌划线至 DDO/AbA 平板仍能长出白色菌, 表明融合子能够激活酵母报告基因 *AURI-C*。二倍体融合菌还能够在 QDO 固体平板长出白色菌落, 证明酵母的另外 2 个报告基因 *HIS3*、*ADE2* 也被激活 (表 3 编号 1)。进一步将融合菌涂布在 QDO/X-α-Gal/AbA 平板, 长出了蓝色菌落, 可见酵母的 4 个报告基因 *HIS3*、*AURI-C*、*ADE2* 和 *MEL1* 同时被激活, 证明 BjSVP 能够与 BoFLC 发生异源相互作用 (表 3、图 2)。酵母载体互换后, Y187[pGADT7-BoFLC] × Y2HGold[pGBKT7-BjSVP]仍可在 QDO/X-α-Gal/AbA 长出蓝色菌落, 进一步证明 BjSVP 确实能够与 BoFLC 异源互作。

表 3 全长 BjSVP 与 BoFLC 相互作用分析
Table 3 Analysis of the interactions between BjSVP and BoFLC in yeast

编号 No.	类型 Type	选择性培养基 Selective agar plates			
		DDO	DDO/AbA	QDO	QDO/X-α-Gal/AbA
1	Y187[pGADT7-BjSVP] × Y2HGold[pGBKT7-BoFLC]	白色 White	白色 White	白色 White	蓝色 Blue
2	Y187[pGADT7-BoFLC] × Y2HGold[pGBKT7-BjSVP]	白色 White	白色 White	白色 White	蓝色 Blue
3	Y187[pGADT-T] × Y2HGold[pGBKT7-53]	白色 White	白色 White	白色 White	蓝色 Blue
4	Y187[pGADT-T] × Y2HGold[pGBKT7-Lam]	白色 White	无 No	无 No	无 No
5	Y187[pGADT7-BjSVP] × Y2HGold[pGBKT7]	白色 White	无 No	无 No	无 No
6	Y187[pGADT7-BoFLC] × Y2HGold[pGBKT7]	白色 White	无 No	无 No	无 No
7	Y187[pGADT7] × Y2HGold[pGBKT7-BjSVP]	白色 White	无 No	无 No	无 No
8	Y187[pGADT7] × Y2HGold[pGBKT7-BoFLC]	白色 white	无 No	无 No	无 No

2.3 BoFLC 作用于 BjSVP 的结构域筛选

在 S1、S2、S3、S4、S5 这 5 个处理组中, 除了 S1 在 DDO/AbA、QDO 和 QDO/X-α-Gal/AbA 上均不能生长之外, 其余均能够在选择性培养基上生长。其中 S3、S4、S5 在 QDO/X-α-Gal/AbA 中呈现明显的蓝色菌落, 而 S2 在 QDO/X-α-Gal/AbA 培养基上着色非常浅, 为淡蓝色 (图 3, 表 4)。

而酵母双杂交系统试剂盒中的阳性对照 (P) 在这 3 种缺陷型培养基中均能生长, 且在含有 X- α -Gal 的培养基中生长呈蓝色; 所有阴性对照 (N、C1 ~ C5、F) 在这 3 种培养基中都不生长(图 3)。以上表明: 截短体 BjSVP Δ 2 (MIK 域)、BjSVP Δ 3 (K 域)、BjSVP Δ 4 (IKC 域)、BjSVP Δ 5 (KC) 均分别能够与 BoFLC 蛋白结合, 激活酵母双杂交系统的 *ADE2*、*AUR1-C*、*HIS3* 和 *MEL1* 报告基因; 而截短体 BjSVP Δ 1 (只含 MI 域, 不含 K 域) 不能够与 BoFLC 相互作用。由此可见: BoFLC 蛋白作用于 BjSVP 的 K 域 (BjSVP Δ 3), 即 BjSVP 第 96 ~ 173 位氨基酸区域。



图 2 全长 BjSVP 与 BoFLC 异源互作
杂交组合的编号同表 3。

Fig. 2 Analysis of the interactions between BjSVP and BoFLC in yeast on the QDO/X- α -Gal/AbA plate
1 - 8: The combination codes of fused strains referred to Table 3.



图 3 截短体 BjSVP Δ 1 ~ BjSVP Δ 11 与 BoFLC 酵母双杂交

S1 ~ S11: BjSVP Δ 1 ~ BjSVP Δ 11 分别与 BoFLC 融合; P 和 N: 酵母双杂交系统的阳性和阴性对照;
C1 ~ C11: BjSVP Δ 1 ~ BjSVP Δ 11 分别与对应空载体融合; F: BoFLC 与对应空载体融合。

Fig. 3 Analysis of the interactions between BjSVP Δ 1 - BjSVP Δ 11 and BoFLC in yeast on the QDO/X- α -Gal/AbA plate
S1 - S11: BjSVP Δ 1 - BjSVP Δ 11 respectively fused with BoFLC; P and N: Positive and negative controls in yeast two-hybrid system kit;
C1 - C11: BjSVP Δ 1 - BjSVP Δ 11 respectively fused with empty vector; F: BoFLC fused with empty vector.

表 4 BjSVP Δ 1 ~ BjSVP Δ 11 与 BoFLC 酵母双杂交

Table 4 Analysis of the interactions between BjSVP Δ 1 - BjSVP Δ 11 and BoFLC in yeast

诱饵蛋白 Bait protein	猎物蛋白 Prey protein	酵母杂交组合 Combinations of yeast two-hybrid	猎物蛋白结构域 Domains of prey	选择性培养基 Selective agar plates			相互作用 Interactions
				DDO/AbA	QDO	QDO/X- α -Gal/AbA	
BoFLC	BjSVP Δ 1	S1	MI	无 No	无 No	无 No	无 No
	BjSVP Δ 2	S2	MIK	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
	BjSVP Δ 3	S3	K	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
	BjSVP Δ 4	S4	IKC	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
	BjSVP Δ 5	S5	KC	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
	BjSVP Δ 6	S6	IK	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
	BjSVP Δ 7	S7	IK ₁ L ₁ K ₂ L ₂	无 No	无 No	无 No	无 No
	BjSVP Δ 8	S8	IK ₁ L ₁ K ₂	无 No	无 No	无 No	无 No
	BjSVP Δ 9	S9	IK ₁ L ₁	无 No	无 No	无 No	无 No
	BjSVP Δ 10	S10	IK ₁	无 No	无 No	无 No	无 No
	BjSVP Δ 11	S11	I	无 No	无 No	无 No	无 No
Murine p53	SV40-T	P	/	白色 White	白色 White	蓝色 Blue	有 Yes
Lam	SV40-T	N	/	无 No	无 No	无 No	无 No

2.4 BjSVP 蛋白作用域 K 域的亚域和连接区筛选

对 BjSVP 氨基酸序列分析 (图 4) 表明, 该蛋白的 K 域 ($K_1L_1K_2L_2K_3$) 含有 3 个亚域 (K_1 、 K_2 、 K_3) 以及 2 个连接区 (L_1 、 L_2), 每个亚域分别形成 1 个独立的 α 螺旋, 共形成 3 个 α 螺旋, L_1 和 L_2 分别连接这些 α 螺旋。为进一步研究 BjSVP 蛋白 K 域中哪个 α 螺旋或者 α 螺旋之间的连接区决定了该蛋白与 BoFLC 的相互作用, 构建了 K 域亚域或连接区的截短体 BjSVP Δ 6 ~ BjSVP Δ 11。酵母转化子 Y187[pGADT7-BjSVP Δ 6] ~ Y187[pGADT7-BjSVP Δ 11] 与 Y2HGold[pGBKT7-BoFLC] 融合后, 依次采用 DDO/AbA、QDO 和 QDO/X- α -Gal/AbA 营养缺陷型培养基进行筛选 (表 4, 图 3)。BjSVP Δ 11(I 域) 与 BoFLC 的酵母杂交组合 S11 不能在 QDO/X- α -Gal/AbA 上长出菌斑, 而 BjSVP Δ 3 (K 域) 或 BjSVP Δ 6 (IK 域) 均能与 BoFLC 杂交 (组合 S3 或 S6), 并在 QDO/X- α -Gal/AbA 生长蓝色菌斑, 同时激活酵母的 4 个报告基因, 进一步说明 BjSVP 与 BoFLC 发生互作依靠 K 域而不是 I 域 (图 3)。但是, 利用 QDO/X- α -Gal/AbA 培养基酵母双杂交 (表 4, 图 3) 筛选发现: BjSVP Δ 7 ($IK_1L_1K_2L_2$ 域) 不能与 BoFLC 互作, 说明删除 K_3 亚域会破坏 BjSVP 与 BoFLC 间的作用; BjSVP Δ 8 ($IK_1L_1K_2$ 域) 也不能与 BoFLC 结合, 说明 L_2 连接区也是该蛋白互作必须的; BjSVP Δ 9 (IK_1L_1 域) 不能与 BoFLC 结合, 同样说明删除 K_2 亚域也会破坏该蛋白互作; BjSVP Δ 10 (IK_1 域) 不能与 BoFLC 结合, 说明 L_1 连接区也是该蛋白互作必须的, 单纯的 K_1 亚域同样不能介导这一蛋白互作。由此可见: 完整的 K 域 ($K_1L_1K_2L_2K_3$) 是 BjSVP 与 BoFLC 异源互作所必须的。

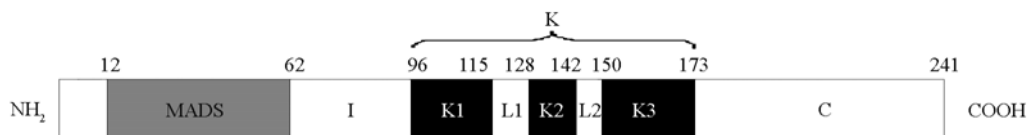


图 4 芥菜 BjSVP 蛋白结构域

MADS、I、K 和 C 表示 MIKC 型蛋白的结构域; K_1 、 K_2 、 K_3 为 K 域的 3 个亚域;
 L_1 、 L_2 分别为 K_1 与 K_2 间、 K_2 与 K_3 间的连接区。

Fig. 4 Domain structure of BjSVP in *Brassica juncea* Coss.

MADS, I, K and C are the domains of BjSVP; K_1 , K_2 and K_3 are the subdomains of K domain;
 L_1 is the linkage region between K_1 and K_2 ; L_2 is the linkage region between K_2 and K_3 .

2.5 BjSVP 蛋白的作用强度

2.5.1 不同结构域对作用强度的影响

方差分析表明, BoFLC 全长与 BjSVP 截短体 (BjSVPn) 互作强度的差异显著 (表 5), 其中截短体 BjSVP Δ 6 (含 IK 域) 与 BoFLC 杂交组合的酶活性 (24.02) 显著高于 BjSVP Δ 3 (只含 K 域) 与 BoFLC 杂交组合 (酶活性为 12.14), 也显著高于其余杂交组合。由此可见 K 域是引发 BjSVP 与 BoFLC 聚合的核心结构域, I 域能显著增强这一作用。而 BjSVP (含有 M 域, 以及 IKC 域) 的作用强度 (酶活性为 0.14) 显著低于 BjSVP Δ 4 (含有 IKC 域) 的强度 (酶活性为 3.33), 可见 M 域的存在会干扰该蛋白异源聚合。另外, BjSVP Δ 6 (含 IK 域) 的作用强度显著高于 BjSVP Δ 4 (含 IK 域, 还含 C 域), 由此推测, C 域也可能会削弱该蛋白互作。

对甘蓝 BoFLCzq 或芥菜 BjFLC 与芥菜 BjSVP 截短体杂交强度分析表明, 其规律均类似于 BoFLC \times BjSVPn (表 5)。其中, BjSVP Δ 6 \times BoFLCzq 作用强度 (酶活性为 9.97) 显著高于 BjSVP Δ 3 \times BoFLCzq (酶活性为 5.38), 并高于 BoFLCzq 的其余杂交组合。而 BjSVP Δ 6 \times BjFLC 作用强度 (酶活性为 4.86) 显著高于 BjSVP Δ 3 \times BjFLC (酶活性为 3.14), 也显著高于 BjSVP \times BjFLC、BjSVP Δ 2 \times BjFLC、BjSVP Δ 4 \times BjFLC、BjSVP Δ 5 \times BjFLC 杂交组合。可见 I 域同样会增强核心作用域 K 域的强度, M

域、C 域也很可能会干扰(削弱)该蛋白互作。

表 5 酵母杂交组合的作用强度

Table 5 Interaction strength of yeast two-hybrid combinations

截短体 BjSVPn Truncated forms of BjSVP		与 BjSVPn 配组的酶活性/Miller Units β -galactosidase activity of combinations			作用强度之比 Ratio of interaction strength		
蛋白名称 Name	结构域 Domain	BoFLC	BoFLCzq	BjFLC	BoFLC \times BjSVPn BjFLC \times BjSVPn	BoFLCzq \times BjSVPn BjFLC \times BjSVPn	BoFLC \times BjSVPn BoFLCzq \times BjSVPn
BjSVP	MIKC	0.14 f	0.10 f	0.08 f	1.75	1.25	1.40
BjSVP Δ 2	MIK	0.51 e	0.91 e	0.19 e	2.68	4.79	0.56
BjSVP Δ 3	K	12.14 b	5.38 b	3.14 b	3.87	1.71	2.26
BjSVP Δ 4	IKC	3.33 c	3.42 c	2.28 c	1.46	1.50	0.97
BjSVP Δ 5	KC	2.62 d	1.34 d	1.65 d	1.59	0.81	1.96
BjSVP Δ 6	IK	24.02 a	9.97 a	4.86 a	4.94	2.05	2.41
平均 Average		7.13	3.52	2.03	2.72	2.02	1.59

2.5.2 不同 FLC 蛋白对作用强度的影响

BoFLC(源于甘蓝‘HM’)、BoFLCzq(源于甘蓝‘ZQ’)、BjFLC(源于芥菜‘QJ’)分别与 BjSVPn(源于芥菜‘QJ’)杂交后,其强度存在明显差异(表 5)。其中,BoFLC 与 BjSVPn 杂交组合的强度均明显高于对应的 BjFLC \times BjSVPn,平均为 2.72 倍,最高达 4.94 倍(与含 IK 域的 BjSVP Δ 6 杂交),最低为 1.75 倍(与含 MIKC 域的 BjSVP 全长蛋白杂交),与 BjSVP Δ 3(核心作用域 K 域)杂交可达 3.87 倍(表 5)。说明 BoFLC 替换 BjFLC 后,可明显提高与 BjSVP 的作用强度。当用 BoFLCzq 替换 BjFLC,与 BjSVP(含 MIKC 域的全长蛋白)杂交后,其强度是 BjFLC \times BjSVP 的 1.25 倍;与 BjSVP Δ 3(核心作用域 K 域)杂交,其强度可提高到 1.71 倍;与 BjSVP Δ 6(IK 域)杂交,强度可提高到 2.05 倍;BoFLCzq \times BjSVPn 平均强度是 BjFLC \times BjSVPn 的 2.02 倍。可见,BoFLCzq 替换 BjFLC 后仍可明显提高与 BjSVP 的作用强度。另外,BoFLC 替换 BoFLCzq 后与 BjSVP 杂交,其蛋白互作强度也存在差异,平均为 1.59 倍。其中与 BjSVP 杂交强度为 1.40 倍,与 BjSVP Δ 3(含核心作用域 K 域)杂交强度为 2.26 倍,与 BjSVP Δ 6(含 IK 域)作用强度为 2.41 倍。说明 BoFLC 的作用强度高于 BoFLCzq。

由此可见,与 BjSVP 作用的 3 种 FLC 强度关系为:BoFLC > BoFLCzq > BjFLC。本试验中,BoFLCzq \times BjSVP Δ 5 稍弱于 BjFLC \times BjSVP Δ 5,BoFLC \times BjSVP Δ 2 弱于 BoFLCzq \times BjSVP Δ 2,BoFLC \times BjSVP Δ 4 弱于 BoFLCzq \times BjSVP Δ 4,这恰恰说明 BjSVP 的 M 域和 C 域对作用强度有一定干扰。

2.6 FLC 蛋白序列分析

BoFLC、BoFLCzq 与 BjFLC 均编码 197 个氨基酸,也为 MIKC 型蛋白,但其结构域和氨基酸序列存在明显差异(图 5),它们的 M 域(图 5,虚线框)均由 51 个氨基酸组成;I 域(M 域与 K 域之间)则分别由 24、24、51 个氨基酸组成;K 域(图 5,实线框)分别由 80、80、54 个氨基酸组成;而 C 域(K 域之后)分别由 34、34、33 个氨基酸组成。BoFLC、BoFLCzq 两者与 BjFLC 在 IK 域上的差异非常明显,它们的 I 域比 BjFLC 少 27 个氨基酸,但 K 域却比 BjFLC 多 26 个氨基酸。而且在 BjFLC 蛋白 I 域与 K 域之间、即 K 域的起始位点缬氨酸(V)处,BoFLC 和 BoFLCzq 在该位点之前多插入了 1 个非极性甘氨酸 G,形成 1 个插入点突变。此外,BoFLC、BoFLCzq 的 C 域比 BjFLC 少 1 个非极性甘氨酸 G(图 5,阴影区),形成 1 个缺失点突变。BoFLC 与 BoFLCzq 仅有 3 个氨基酸位点不同(图 5),但与 BjSVP 的作用强度却相差很大(表 5),说明其差异应该来源于这 3 个氨基酸。第 1 个差异点位于 I 域内第 20 位氨基酸:BoFLCzq、BoFLC 和 BjFLC 分别为天冬酰胺 N、赖氨酸 K、谷氨酸 E(图 5,方形框);第 2 个差异点位于 K 域内第 65 位氨基酸:BoFLCzq、

BoFLC 和 BjFLC 分别为谷氨酸 E、缬氨酸 V、谷氨酸 E（图 5，圆形框）；第 3 个差异点位于 C 域内第 32 位氨基酸：分别为精氨酸 R、脯氨酸 P、脯氨酸 P（图 5，菱形框）。

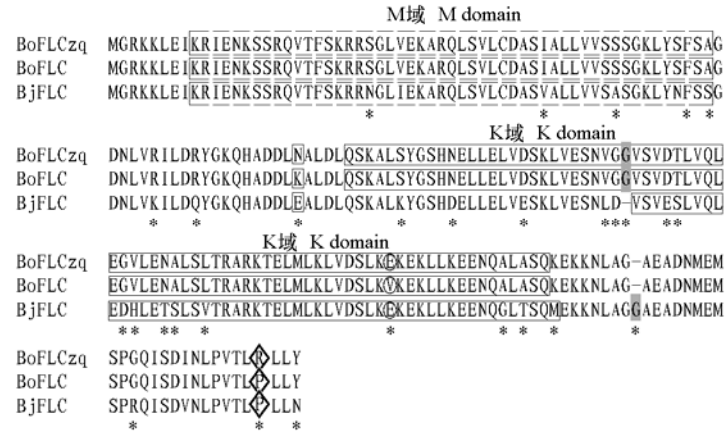


图 5 BoFLC、BoFLCzq 和 BjFLC 序列分析

阴影区为插入或缺失位点；BoFLC 与 BoFLCzq 之间的 3 个不保守位点分别用方形框、圆形框和菱形框表示；BoFLC、BoFLCzq、BjFLC 的不保守氨基酸下方用*标注。

Fig. 5 Analysis of BoFLC, BoFLCzq and BjFLC

The sites of insertion or deletion amino acids are shaded; Square, circular and rhombus frames represent the three nonconservative amino acids between BoFLC and BoFLCzq; * represent nonconservative amino acids sites among BoFLC, BoFLCzq and BjFLC.

3 讨论

3.1 M、I、K、C 结构域在同源或异源作物蛋白聚合中的作用

SVP 和 FLC 是生殖发育转变的关键抑制因子，其蛋白互作能调节开花时间（Li et al., 2008; Mentzer et al., 2010; Crevillén & Dean, 2011; Kim & Sung, 2012）。尽管甘蓝 FLC 转基因聚合到芥菜后的开花时间、花器官发育等外在表型已有研究（杨海鹏 等, 2013），但是异源 FLC 与 SVP 之间内在互作分子机理还未涉及。本试验利用酵母双杂交系统证明了芥菜 BjSVP 与甘蓝 BoFLC 确实能异源互作，BjSVP 作用域为 K 域，I 域能增强该作用，但 M 域或 C 域会干扰（削弱）该作用。

Yang 等（2003）和 Kerstin 等（2005）也表明，K 域是 MIKC 型蛋白 APETALA3 与 PISTILLATA 在拟南芥中相互作用的核心域，I 域能增强该作用。M 域会削弱 APETALA3 与 PISTILLATA 蛋白二聚化（Yang et al., 2003）、也干扰 SEP1 与 AP3 蛋白二聚化（Yang & Thomas, 2004），推测在酵母双杂交系统中 M 域的 α 螺旋和 β 片层的空间结构可能会在一定程度上阻碍自身蛋白与其他蛋白的结合能力（Theißen et al., 1996; Kerstin et al., 2005）。由此可见：MIKC 型蛋白在同源作物中的作用机制与本研究 BjSVP 与 BoFLC 异源互作机制具有相似之处。Pelaz 等（2001）研究了 C 域的调节作用，发现 APETALA1 和 SEPALLATA3 能异源互作，C 域可增强或稳定受 K 域调节的这种蛋白互作。而本研究结论与此相反，C 域削弱了异源蛋白 BoFLC 与 BjSVP 互作，BjSVP/BoFLC 互作模式与 APETALA1/SEPALLATA3 并不完全相同。MIKC 型蛋白互作核心域为 K 域，它能形成 3 个 α 螺旋（Immink et al., 2010）。APETALA1 蛋白 C 域中也具有 1 个 α 螺旋，它与 K 域的 α 螺旋相互独立，这可能增强了蛋白互作（Riechmann et al., 1996）。而 BoFLC 或 BjSVP 蛋白 K 域的 α 螺旋延伸到 C 域，受 C 域调节，且 C 域中无独立 α 螺旋，由此可能削弱了该作用。

3.2 K 域亚域与连接区在同源或异源作物蛋白聚合中的贡献

本试验表明：芥菜 BjSVP 蛋白 K 域的亚域（K1、K2 和 K3）或连接区（L1 和 L2）删除后不能

与异源作物甘蓝 BoFLC 聚合,说明 K1、K2、K3、L1 和 L2 对该异源蛋白互作同样重要。但是 Yang 等 (2003) 对 AP3 与 PI 在同源作物拟南芥中的相互作用研究表明:K 域的前 2 个 α 螺旋 (K1 和 K2) 以及 L1 连接区是 AP3/PI 聚合体的关键作用区,而 K3 亚域和 L2 不能增强该作用。说明 K1、K2、K3 亚域和 L1、L2 连接区对拟南芥 AP3/PI 聚合体具有不同的贡献。本实验室最近研究也显示:BjSVP 的 K1 亚域与 BjFLC 的 K1 亚域能在同源作物芥菜中蛋白互作;BjSVP 的 K2 亚域可增强该作用,但 L2 连接区 (位于 K2 与 K3 之间) 有削弱作用,而 L1 连接区 (位于 K1 与 K2 之间) 和 K3 亚域对此无影响 (数据未列出)。可见,FLC 与 SVP 蛋白在同源作物和异源作物中的互作机制确实存在差异,这一差异很可能是芥菜 FLC 与甘蓝 FLC 氨基酸序列和蛋白空间结构等的不同所致。

3.3 氨基酸位点变异在蛋白聚合体中的可能作用

Yang 等 (2003) 对 K 域氨基酸位点突变表明:在 PI 蛋白中,除了第 98 位天冬酰胺之外,主要通过 K1 亚域的疏水氨基酸控制 AP3/PI 互作强度。在 DEF 和 GLO 子家族中 Asn-98 高度保守,但在其他 MADS 子家族中并非如此。Asn-98 突变为 Leu 或 Val 后,尽管 AP3/PI 相互作用强度会降为野生型的 3%~15%,但在第 98 位起关键作用的是某些极性 (主控) 氨基酸而不是 Asn。在 AP3 蛋白的 Glu-96、Arg-99 和 Arg-102 中,Arg-102 对 AP3/PI 相互作用的贡献强于 Glu-96 与 Arg-99。说明氨基酸位点突变或变异可以调节 MIKC 型蛋白聚合体的作用强度。本试验用 BoFLC、BoFLCzq 替换 BjFLC 后,可明显增强对 BjSVP 的作用。相对 BjFLC 而言,BoFLC、BoFLCzq 蛋白 K 域的插入点突变甘氨酸、C 域的缺失点突变甘氨酸、K 域前端增加的 28 个氨基酸以及该蛋白的非保守位点可能会引起 BoFLC (或 BoFLCzq) 蛋白折叠或卷曲等空间构象改变或亲和能力变化,从而导致蛋白互作强度增加,但还需深入研究。此外,BoFLC 与 BoFLCzq 仅有 3 个氨基酸位点差异 (I 域内第 20 位、K 域内第 65 位和 C 域内第 32 位),却导致作用强度相差很大,因此也有必要进一步对这些位点进行点突变和转基因功能验证。

References

- Cho H J, Kim J J, Lee J H, Kim W, Jung Jae-Hoon, Park Chung-Mo, Ahn J H. 2012. SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in *Arabidopsis*. FEBS Letters, 586: 2332 - 2337.
- Crevillén P, Dean C. 2011. Regulation of the floral repressor gene FLC: The complexity of transcription in a chromatin context. Curr Opin Plant Biol, 14 (1): 38 - 44.
- Fujiwara S, Oda A, Yoshida R, Niinuma K, Miyata K, Tomozoe Y, Tajima T, Nakagawa M, Hayashi K, Coupland G, Mizoguchi T. 2008. Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in *Arabidopsis*. Plant Cell, 20: 2960 - 2971.
- Gao Jin, Wang Hai-xia, Li Jing-jing, Yu Yan. 2009. Measuring the report gene of β -galactosidase activity in yeast. Journal of Shanghai Jiao Tong University, 29 (2): 236 - 240. (in Chinese)
- 郜 尽, 王海侠, 李京敬, 俞 雁. 2009. 酵母双杂交报告基因 β -半乳糖苷酶活性测定方法的研究. 上海交通大学学报, 29 (2): 236 - 240.
- Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of SVP, a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. Plant J, 21: 351 - 360.
- Hassan S, Callista B R, Hesham F O, Zahra S, Mariam B S. 2005. Delay in flowering and increase in biomass of transgenic tobacco expressing the *Arabidopsis* floral repressor gene *FLOWERING LOCUS C*. Journal of Plant Physiology, 162: 711 - 717.
- Immink R G, Kaufmann K, Angenent G C. 2010. The 'ABC' of MADS domain protein behaviour and interactions. Seminars in Cell & Developmental Biology, 21: 87 - 93.
- Jung C, Müller A E. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. Trends in Plant Science, 14 (10): 563 - 573.
- Kerstin K, Rainer M, Gqnter T. 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: Structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. Gene, 347: 183 - 198.
- Kim D H, Sung S. 2012. Environmentally coordinated epigenetic silencing of FLC by protein and long noncoding RNA components. Curr Opin Plant

- Biol, 15 (1): 51 - 56.
- Lee J H, Park S H, Lee J S, Ahn J H. 2007. A conserved role of *SHORT VEGETATIVE PHASE(SVP)* in controlling flowering time of *Brassica* plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769: 455 - 461.
- Li D, Liu C, Shen L S, Wu Y, Chen H Y, Masumi R, Chris A H, Toshiro I, Elliot M, Yu H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 15 (1): 110 - 120.
- Li Z M, Zhang J Z, Mei L, Deng X X, Hu C G, Yao J L. 2010. *PtSVP*, an *SVP* homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristem determination and affects flower development in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Plant Mol Biol*, 74: 129 - 142.
- Martínez-Castilla L P, Alvarez-Buylla E R. 2003. Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *PNAS*, 100 (23): 13407 - 13412.
- Mentzer L, Yee T, Wang T Y, Himelblau E. 2010. *FLOWERING LOCUS C* influences the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Genesis*, 48 (12): 680 - 683.
- Michaels S D, Amasino R M. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11: 949 - 956.
- Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohalmi S E, Crosby W L, Yanofsky M F. 2001. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J*, 26: 385 - 394.
- Riechmann J L, Krizek B A, Meyerowitz E M. 1996. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (10): 4793 - 4798.
- Tang Qing-lin, Ding Ning, Li Nian-zu, Wang Zhi-min, Song Ming. 2013. Evaluation of acting domain and strength mediating the protein self-interactions of *SVP* and *FLC* in *Brassica juncea*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (4): 675 - 684. (in Chinese)
- 汤青林, 丁宁, 李念祖, 王志敏, 宋明. 2013. 芥菜开花负调因子 *SVP* 及 *FLC* 同源互作域筛选和作用强度分析. *园艺学报*, 40 (4): 675 - 684.
- Tang Qing-lin, Li Nian-zu, Ding Ning, Chen Zhu-rui, Song Ming, Wang Zhi-min. 2012. Determination of interactions between *SVP* and *FLC* in *Brassica juncea* Coss. by yeast two-hybrid system. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1175 - 1182. (in Chinese)
- 汤青林, 李念祖, 丁宁, 陈竹睿, 宋明, 王志敏. 2012. 芥菜开花调控蛋白 *SVP* 与 *FLC* 酵母表达载体的构建及其相互作用研究. *园艺学报*, 39 (6): 1175 - 1182.
- Tang Qing-lin, Xu Jun-qiang, Song Ming, Wang Zhi-min. 2011. Determination of interactions between the two determinant transcription factors of flowering signal integrators *in vitro* in *Brassica juncea* Coss. (Mustard). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2317 - 2324. (in Chinese)
- 汤青林, 许俊强, 宋明, 王志敏. 2011. 芥菜开花信号整合子的两个核心转录因子 *FLC* 和 *SVP* 相互作用的体外检测. *园艺学报*, 38 (12): 2317 - 2324.
- Theißen G, Kim J T, Saedler H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, 43: 484 - 516.
- Yang Hai-peng, Cai Yi-ming, Zhang Qian, Ren Xue-song, Si Jun, Li Cheng-qiong, Song Hong-yuan. 2013. Influence of over-expression of the *BoFLC3* and *AtFT* genes on flowering time and cold tolerance in *Brassica juncea*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (7): 1278 - 1288. (in Chinese)
- 杨海鹏, 蔡一鸣, 张茜, 任雪松, 司军, 李成琼, 宋洪元. 2013. 超量表达 *BoFLC3*、*AtFT* 对芥菜开花期和抗寒性的影响. *园艺学报*, 40 (7): 1278 - 1288.
- Yang Pu-li, Zhang Dan-hua, Liu Zhi-yu, Xu Jun-qiang, Wang Zhi-min, Tang Qing-lin, Song Ming. 2013. *In vitro* expression and on the interactions between *FLC* and *SVP* from repressors of bolting in *Brassica oleracea* L. *Plant Physiology Journal*, 49 (9): 935 - 942. (in Chinese)
- 杨朴丽, 张丹华, 刘智宇, 许俊强, 王志敏, 汤青林, 宋明. 2013. 甘蓝抽薹开花抑制因子 *FLC* 与 *SVP* 体外表达及相互作用. *植物生理学报*, 49 (9): 935 - 942.
- Yang Y Z, Laura F, Thomas J. 2003. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA*. *Plant J*, 33: 47 - 59.
- Yang Y Z, Thomas J. 2004. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Molecular Biology*, 55: 45 - 59.