

## 光皮桦成花相关 MADS-box 基因 *BIMADS1* 的克隆与表达

赵传慧, 周厚君, 童再康, 林二培, 黄华宏, 牛明月

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

**摘要:** MADS-box 家族基因广泛分布于植物中, 在花发育过程中起着重要调控作用。采用同源克隆结合 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)在光皮桦 *Betula luminifera* 中克隆到 1 个 MADS-box 基因, 命名为 *BIMADS1*。该基因可能存在 2 个不同的转录本 *BIMADS1S* 和 *BIMADS1L*: 前者为 1 150 bp, 编码 254 个氨基酸, 具有 MADS-box 基因的典型结构, 与欧洲白桦 *Betula pendula* 的同源基因相似性最高(97%); 后者长 1 312 bp, 但仅含有 690 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 229 个氨基酸, 缺失 MADS-box 蛋白的 C 端。这种缺失可能由内含子可变剪切造成。同源比对和系统进化分析表明: *BIMADS1* 属于 AP1/SQUA 亚家族的 AGL79 这一分支。定量聚合酶链式反应(PCR)表达分析表明: *BIMADS1* 基因在根、茎、叶和花器官中均有表达, 但 *BIMADS1S* 和 *BIMADS1L* 这 2 个转录本表达模式存在差异。雄花序发育过程中, *BIMADS1* 的 2 个转录本的表达峰值均在萌动雄花序时期; 而在雌花序发育过程中, *BIMADS1L* 和 *BIMADS1S* 表达水平的峰值分别出现在初生雌花芽和萌动雌花序。图 6 表 1 参 27

**关键词:** 林木育种学; 光皮桦; 开花; MADS-box; 表达分析

**中图分类号:** S722.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2015)02-0221-08

### Cloning and expression analysis of a floral related MADS-box gene *BIMADS1* from *Betula luminifera*

ZHAO Chuanhui, ZHOU Houjun, TONG Zaikang, LIN Erpei, HUANG Huahong, NIU Mingyue

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A and F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** As a highly conserved transcription factor family in plants, MADS-box genes play important roles in floral development and regulation of other developmental processes. However, few floral related MADS-box genes have been characterized in *Betula luminifera*. In this study, a MADS-box gene, *BIMADS1*, was cloned from *Betula luminifera* by using homologous cloning and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. Afterward expression analysis was also conducted. Results of the sequence analysis indicated that *BIMADS1* probably had two different transcripts--one was 1 150 bp in length and contained a 765 bp open reading frame (ORF) encoding 254 amino acid residues. This protein was a typical MADS-box protein belonging to the AP1/SQUA subfamily. The other transcript contained an insertion of 162 bp at the 3'-terminal. The ORF of this transcript was only 690 bp in length encoding 229 amino acid residues with a truncated C terminal, which may have been caused by intron's alternative splicing. The expression analysis also indicated that *BIMADS1* was expressed in all tissues, but showed different expression patterns on its two transcripts during inflorescence development. During male inflorescence development, the highest expression of both these two transcripts was detected in the germinating male inflorescence; whereas, during development of the female inflorescence, the

收稿日期: 2014-02-20; 修回日期: 2014-03-18

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3110453); 浙江省农业科技重点项目(2011C12014); 浙江农林大学人才启动项目(2010FR064); 浙江省重点科技创新团队资助项目(2009R50035-9)

作者简介: 赵传慧, 从事林木遗传育种研究。E-mail: 671469086@qq.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 博士生导师, 从事林木遗传育种研究。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

highest level of *BLMADS1L* was shown in the germinating female inflorescence buds and the highest level of *BLMADS1S* was found in the developing female inflorescence. Our study provides basic knowledge about MADS-box genes in *Betula luminifera*, and will be facilitate further investigation of *BLMADS1*'s function and regulation mechanism in future. [Ch, 6 fig. 1 tab. 27 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Betula luminifera*; flowering; MADS-box; expression analysis

MADS-box 基因是一类数目庞大、高度保守并广泛分布的基因家族,在植物、动物、酵母等真核生物中都发现了该类基因的存在<sup>[1]</sup>。植物 MADS-box 基因均编码转录因子,除了主要参与花、果实等生殖发育的调控外,还对根、叶等营养器官的发育起着重要作用<sup>[2-7]</sup>。在高等植物中,MADS-box 基因编码蛋白是由高度保守的 MADS-box 域(M 域),较为保守的 K 域,相对保守的 I 域和多变的 C 域组成,属于 MIKC 型<sup>[8-10]</sup>。MADS-box 基因及其功能的研究大多集中在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和金鱼草 *Antirrhinum majus* 等草本模式植中,在林木中的研究较少。目前,仅有杨树 *Populus trichocarpa*, 欧洲白桦 *Betula pendula*, 苹果 *Malus domestica* 等少数几个树种上有相关报道。例如,在欧洲白桦存在 3 个 *API/SQUA-like* 基因 *BpMADS3*, *BpMADS4* 及 *BpMADS5*, 它们在雄花序和雌花序发育过程中大量表达;转基因表明 *BpMADS4* 基因能促进苹果开花<sup>[11]</sup>,还有助于延缓杨树衰老和休眠,*BpMADS4* 基因不仅在花序发育起始阶段发挥重要作用,还参与营养生长向生殖发育的转变<sup>[12]</sup>。光皮桦 *Betula luminifera*, 属桦木科 Betulaceae 桦木属 *Betula* 落叶乔木,是一种用途广泛的珍贵阔叶用材树种<sup>[13]</sup>。光皮桦材质优良,经济价值高,多数种质童期较短(1.5 a),种内具有丰富变异,是优良的林木遗传研究材料。近年来,光皮桦的遗传改良工作逐渐受到重视<sup>[14-16]</sup>。然而,对于光皮桦开花相关基因的功能及其调控机制研究甚少。本研究以光皮桦无性系植株为材料,克隆光皮桦开花相关基因 *BLMADS1*,分析其序列特征。通过分析 *BLMADS1* 在光皮桦不同器官及不同发育时期花器官中的表达特性,初步明确了 *BLMADS1* 与光皮桦成花间的相关性。这些研究结果为利用分子生物学手段调控光皮桦开花,促进其营养生长,提高木材产量奠定了一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以浙江农林大学林木良种繁育中心的光皮桦无性系苗(6年生)为试验材料,1月中旬至3月底按照叶和雌花序、雄花序等器官的不同发育阶段分别取材:幼叶(L1),嫩叶(L2),成熟叶(L3);萌动雌花芽(FB1),初生雌花芽(FB2),初生雌花序(FI1),发育雌花序(FI2),成熟雌花序(FI3);休眠雄花序(MI1),萌动雄花序(MI2),成熟雄花序(MI3)。-80℃保存备用。

### 1.2 总核糖核酸(RNA)的提取与 cDNA 合成

植物材料经液氮预冻后研磨,以 PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)试剂盒提取总 RNA,SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)反转录合成 cDNA,用于基因克隆和表达分析。

### 1.3 基因克隆

鉴于光皮桦和欧洲白桦的亲缘关系和 MADS-box 基因的保守性,根据欧洲白桦 MADS-box 家族 *API/SQUA-like* 基因(Genbank 号为 X99653, X99654, X99655)的 MADS 区,设计引物 MADS-GSP2 进行 3'-RACE。根据获得的 3'-RACE 产物序列设计引物 MADS-GSP1 进行 5'-RACE 扩增基因的 5'端序列。将 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)获得的序列进行拼接,在 5'和 3'非编码区位置,设计特异引物 M1-F 和 M1-R,进行聚合酶链式反应(PCR)扩增基因全长序列。根据 MADS-box 基因的结构,设计特异引物 MG-F 和 MG-R,克隆 *BLMADS1* 基因 3'端部分序列,以验证其可变剪切是否存在。克隆涉及引物列于表 1。RACE 采用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech),具体的操作过程按照试剂盒说明书进行。全长克隆采用 Hifi-taq(TransGen Biotech),聚合酶链式反应(PCR)按照试剂说明书进行。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后,利用凝胶回收试剂盒(Axygen)进行回收,回收产物连接到载体 pMD19-T 载体,转化进入 *E. coli* DH5α 感受态细胞,挑取阳性克隆由南京金斯瑞公司进行序列测定。

## 1.4 序列分析

采用 Vector NTI 11.0(Invitrogen)进行序列拼接和多序列比对。利用 Nucleic Tools (<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz-page+applSelect>)分析推测基因编码蛋白的氨基酸组成。利用蛋白质保守结构域推测工具 InterProScan(<http://ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)分析其结构域。基于拟南芥, 水稻 *Oryza sativa*, 杨树, 番茄 *Solanum lycopersicum* 的 API/SQUA-like MADS-box 蛋白中 MIK 区氨基酸序列, 采用 MEGA 4.0 软件(邻接法)进行多序列比较, 对光皮桦 *BIMADS1* 进行系统进化分析<sup>[17]</sup>, 所用序列来自数据库 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。具体的基因名和序列号参考 Shan 等<sup>[18]</sup>的报道。

## 1.5 实时定量 PCR

以光皮桦 *Actin* 基因(Genbank 号为 FJ410442)为内参, 采用相对定量的方法, 对 *BIMADS1* 基因 2 个转录本的组织表达特性及其在不同器官发育过程中的表达规律进行分析。按照 SYBR Premix Ex *Taq* II (TaKaRa)说明书进行定量 PCR 操作, 扩增反应程序为 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 10 s, 40 个循环。内参基因 *Actin* 的引物为 Actin-Q-F 和 Actin-Q-R, *BIMADS1L* 的引物为 M1-Q-F 和 M1-Q-R, *BIMADS1S* 的引物为 M1-Q-F 和 M1-Q-R2(表 1)。重复 3 次·试验<sup>-1</sup>。

表 1 用于基因克隆和表达分析的引物

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis

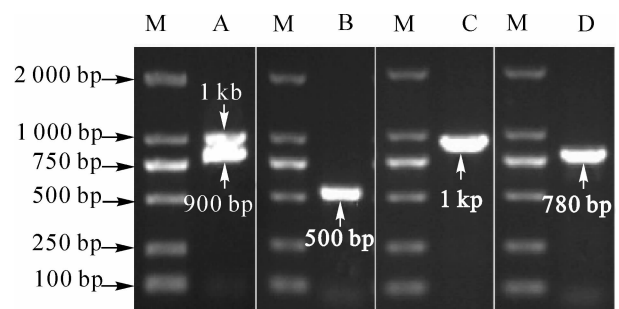
| 引物名称      | 序列(5'→3')                  | 退火温度/°C | PCR 产物长度/bp |
|-----------|----------------------------|---------|-------------|
| MADS-GSP2 | ATGGGGMGAGGWAGGGTTCAG      | 60      | 1 000       |
| MADS-GSP1 | CAGTTGCCATAAGGTGTCGGT      | 58      | 500         |
| M1-F      | ATGGGGCGAGGAAGGGTTCAG      | 57      | 1 000 和 780 |
| M1-R      | TTATCCATTTATATGGCTAAG-3'   | 57      |             |
| M1-Q-F1   | CGACGCTACCACTTCCTTCTCTAAC  | 60      | 92          |
| M1-Q-R1   | AGCAGTTGCCATGAATCAACACACAT | 60      |             |
| M1-Q-F2   | CGACGCTACCACTTCCTTCTCTAAC  | 60      | 132         |
| M1-Q-R2   | CCATTTATATGGCTAAGCATCCAAG  | 60      |             |
| Actin-Q-F | GCCAACAGAGAAAAGATGACTC     | 60      | 128         |
| Actin-Q-R | TCACCAGAATCCAGCACAATAC     | 60      |             |
| MG-F      | CGACGCTACCACTTCCTTCTCTAAC  | 55      | 338         |
| MG-R      | GACTTTGGTGGCTCGAAAAGTCT    | 55      |             |

## 2 结果与分析

### 2.1 *BIMADS1* 基因的克隆与序列分析

根据高度保守的 MADS 区设计简并引物(MADS-GSP2), 用于光皮桦 MADS 基因 3'端序列的分离。

以光皮桦茎、叶、花序和根等混合组织的 cDNA 为模板, 进行 3'-RACE 获得 2 个约 1 kb 的片段, 克隆测序表明这 2 个序列分别长 1 099 bp 和 937 bp, 这 2 个片段仅在靠近 3'端的编码区存在差异, 且差异序列具有典型的内含子特征(GT-AG)(图 1 和图 2A)。根据所得 3'端序列设计特异引物(MADS-GSP1)进行 5'-RACE, 获得长约 500 bp 的片段(图 1), 测序拼接获得长 1 284 bp 和 1 104 bp 的 2 条序列(图 2)。根据这些序列, 在序列 2 端设计特异引物 M1-F1 和 M1-R1 扩增到包含完整开放阅读框(ORF)在内的序列, 获得了预期大小的 2 个片段(图 1), BLAST 结果也显示这 2 条序列为 MADS-Box 基因。这表明在光皮桦中该基因存在 2 个不同的转录

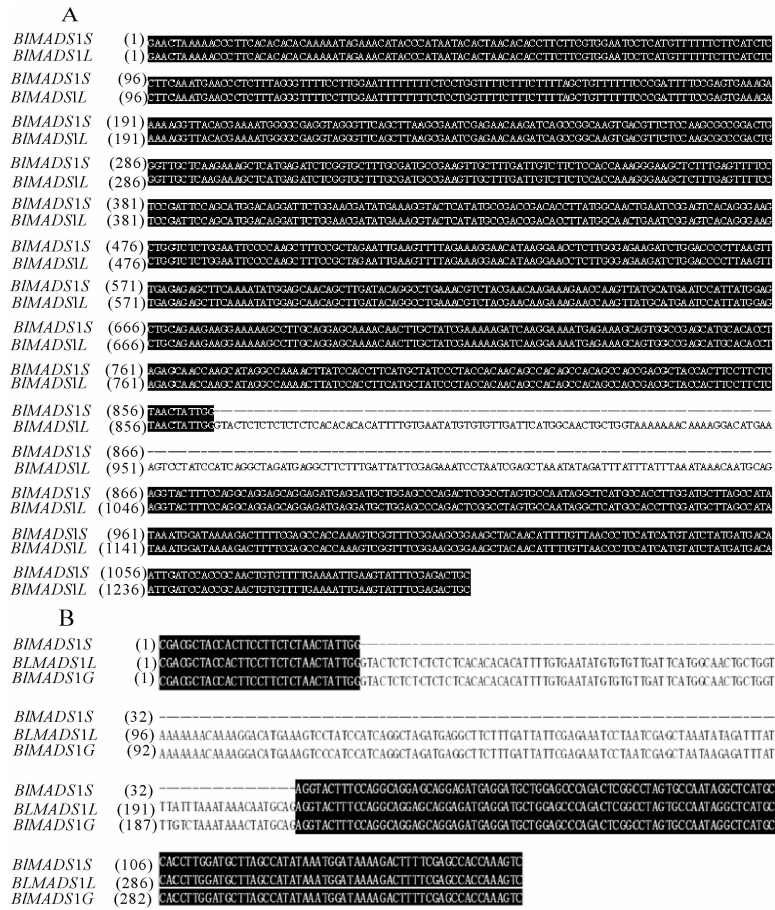


A: 3'-RACE 扩增获得约 1 Kb 和约 900 bp 的片段;  
B: 5'-RACE 扩增获得约 500 bp 的片段;  
C: *BIMADS1-L* 长转录本扩增;  
D: *BIMADS1-S* 短转录本扩增。  
M: DNA Marker DL2000。箭头表示目的片段。

图 1 *BIMADS1* 基因 PCR 产物电泳分析

Figure 1 Electrophoresis of PCR products for *BIMADS1*

本, 因此将该基因命名为 *BIMADS1*, 并将其 2 个不同的转录本分别命名为 *BIMADS1L* (长转录本) 和 *BIMADS1S* (短转录本)。为了验证 *BIMADS1L* 中 3' 端多余的序列是否为内含子, 在基因组中是否存在, 在这 2 个转录本差异区域的 2 端设计引物 (MG-F 和 MG-R), 以光皮桦基因组 DNA 为模板克隆其对应的基因组序列。结果表明: PCR 扩增得到的基因组片段和 *BIMADS1L* 转录本对应片段的序列一致。这说明 *BIMADS1* 基因 2 个转录本间序列的差异可能是由内含子的可变剪切引起的 (图 2B)。



*BIMADS1S* 为 *BIMADS1* 的短转录本, *BIMADS1L* 为 *BIMADS1* 的长转录本, *BIMADS1G* 为 *BIMADS1* 3' 端对应的基因组序列。

图 2 *BIMADS1* 的 2 个转录本序列分析

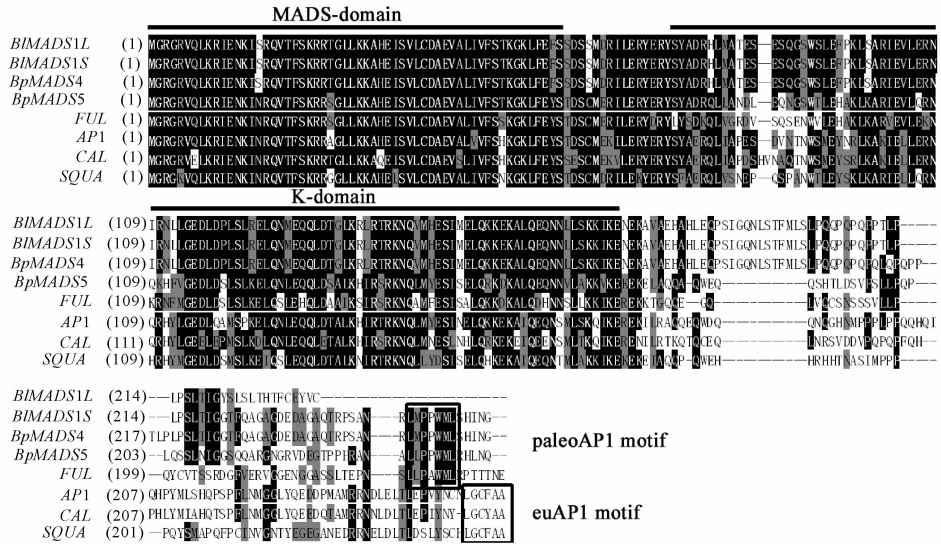
Figure 2 Sequence alignment for two transcripts of *BIMADS1*

### 2.2 *BIMADS1* 编码蛋白分析

序列分析表明: *BIMADS1S* 包含 1 个 765 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 254 个氨基酸; 而 *BIMADS1L* 由于含有未剪切的内含子, 造成提前终止, 仅包含 1 个 690 bp 的 ORF, 编码 229 个氨基酸。同源序列比对显示 *BIMADS1S/L* 与欧洲白桦 *Betula pendula* MADS4 蛋白相似性最高, 分别达 97% 和 85%, 而与拟南芥 AP1 蛋白的相似性则分别为 68% 和 67% (图 3)。进一步的序列比对表明这 2 个蛋白均具有典型的 MADS-box 和 K-domain, *BIMADS1S* 编码的蛋白在 C 末端具有 AP1/SQUA-like MADS-box 基因亚家族的特征性 paleoAP1 motif, 而 *BIMADS1L* 编码的蛋白由于序列提前终止而造成 paleoAP1 motif 的缺失 (图 3)。这些结果表明: 光皮桦 *BIMADS1* 基因属于 AP1/SQUA 亚家族, 且可变剪切造成的 2 个不同转录本编码不同的蛋白。

### 2.3 *BIMADS1* 的系统进化分析

已有的研究表明真双子叶植物 AP1/SQUA-like MADS-box 在进化中经历了 2 次倍增事件 (duplication), 形成了 euAP1, euFUL 和 AGL79 这 3 个主要分支<sup>[15]</sup>。为了分析 *BIMADS1* 与其同源基因的进化关系, 选取来自金鱼草、拟南芥、欧洲白桦等植物的 AP1/SQUA-like 同源基因进行系统进化分析。分析结果显示: 光皮桦 *BIMADS1* 属于 AP1/SQUA-like 亚家族 AGL79 分支, 其与同属的欧洲白桦



欧洲白桦 *Betula pendula* CAA67968, CAA67969; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* NP\_177074, Q38876, NP\_564243; 金鱼草 *Antirrhinum majus* CAA45228。高度保守 MADS-box 及 K-domain 分别用横线标出, euAP1motif 和 paleoAP1motif 分别用方框标出。

图 3 *BIMADS1* 同源比对和序列分析  
Figure 3 Sequence alignment and analysis of *BIMADS1*

*BIMADS4* 亲缘最近, 其次是切花菊 *Chrysanthemum grandiflorum* 的 CDM41, 而与拟南芥的 *AGL79* 亲缘较远(图 4)。

### 2.4 *BIMADS1* 基因的表达分析

本研究采用光皮桦 *Actin* 基因作为内参, 对 *BIMADS1* 基因 2 个转录本的组织表达特性及其在光皮桦不同发育阶段的雄花序、雌花序和叶片(图 5)中的表达规律进行了分析, 结果如图 6 所示。*BIMADS1* 在所有检测组织中均有表达, 但 2 个转录本有不同的表达模式。*BIMADS1L* 在雌花芽(FB)和雄花序(MI)中表达量较高, 在根中的表达量最低; *BIMADS1S* 在雌雄花序中表达量较高, 在茎中表达量最低(图 6A); 在不同发育阶段的花序和叶片中, *BIMADS1L* 在初生的雌花芽(FB2)中表达量最高, 而在其他阶段的雌花序中表达量极低, 在雄花序中则主要在萌动雄花序(MI-2)中表达, 在成熟的雄花序中几乎不表达; 而 *BIMADS1S* 的表达高峰分别出现在萌动雄花序(MI-2)和发育的雌花序(FI-2)(图 6B); 此外, *BIMADS1* 在不同发育状态的叶片中的表达差异不明显(图 6B)。这些结果说明: *BIMADS1* 基因在光皮桦雌雄花序萌动成熟的过程中起主要调控作用, 并且还可能与光皮桦雌花序发育的启动相关。

## 3 讨论

MADS-box 基因家族是植物中较大的基因家族, 序列上具有保守性, 结构上也有一定的相似性, 但在不同物种甚至不同的组织器官之间, MADS-box 基因在功能上存在着很大的差异<sup>[19]</sup>。目前, 虽然在多种植物中均发现了 MADS-box 转录因子, 如在拟南芥中存在 100 多个 MADS-box 基因, 除少数几个 MADS-box 基因已研究表明在拟南芥花发育中发挥着重要作用, 还有超过 80% 的 MADS-box 基因功能是未知的<sup>[20]</sup>。同样地, 在多数林木中, MADS-box 基因的功能仍不明确, 其与林木成花或其他发育过程的相关性也有待进一步研究。

本研究以童期较短的用材树种光皮桦为材料, 采用同源克隆和 RACE 的方法从光皮桦中克隆得到了 1 个 MADS-box 基因, 命名为 *BIMADS1*。序列分析的结果表明: *BIMADS1* 基因属于 AP1/SQUA 亚家族, 且该基因存在 2 个不同的转录本, 可能是由于 3'-端内含子的可变剪切造成的。*BIMADS1* 基因的 2 个转录本均编码典型的 MADS-box 蛋白, 具有保守的 MADS-box 和 K-domain, 而较长的转录本由于内含子的存在而提前出现终止子, 使其编码的蛋白在 C 末端缺失其特征性的 paleoAP1 motif。类似的可变剪切造成的 C 末端缺失在其他 AP1/SQUA 类 MADS-box 基因也有发现<sup>[15,21-22]</sup>。这暗示这种内含子的可变剪切可能是 AP1/SQUA-like MADS-box 基因调控的方式之一。

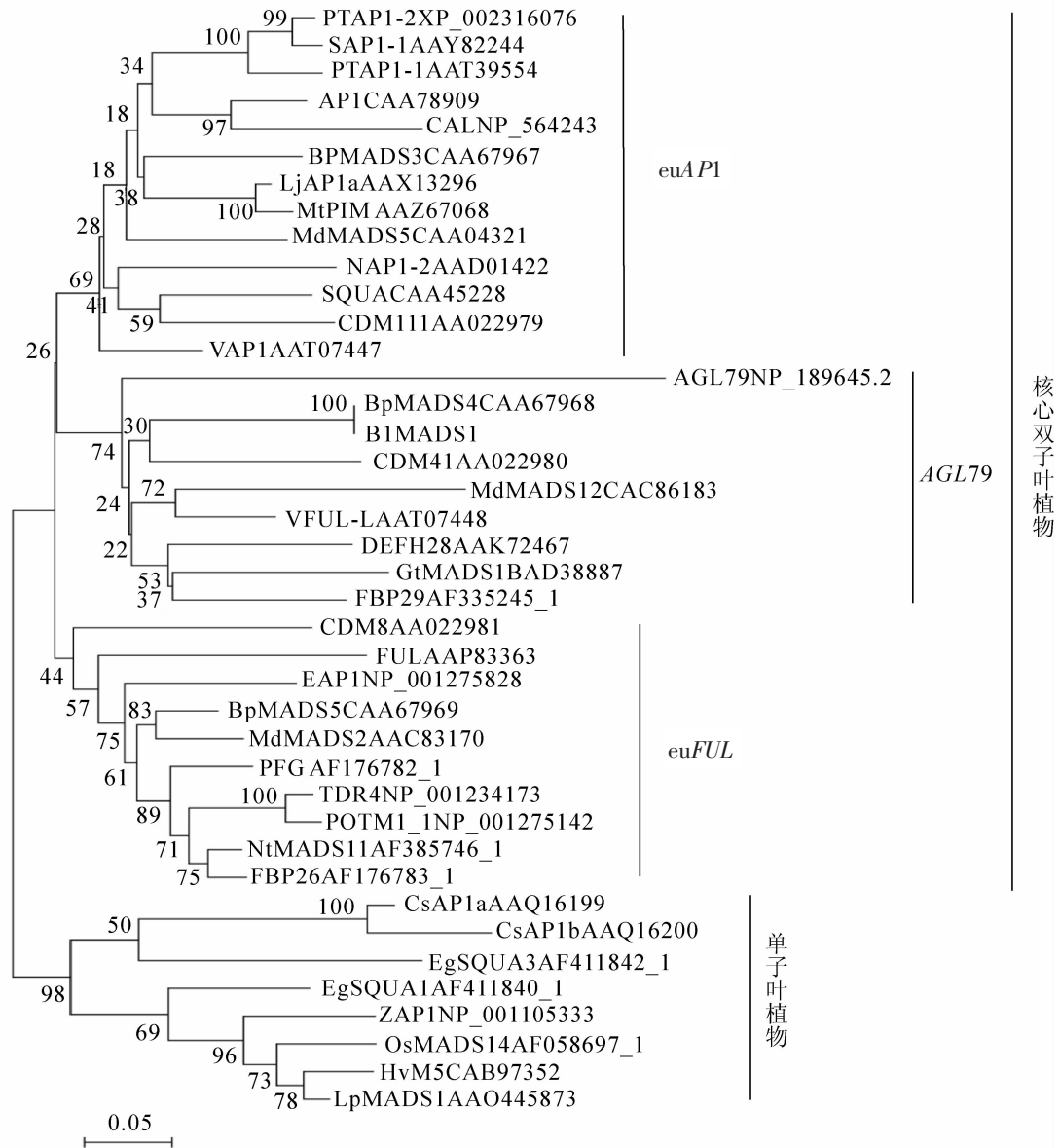


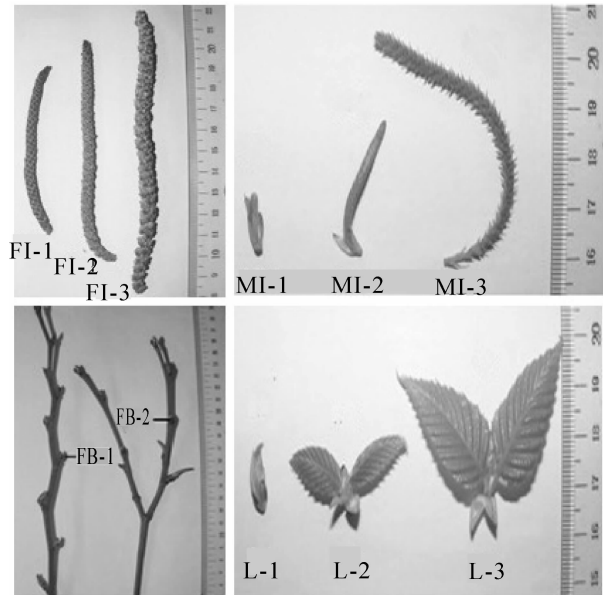
图4 光皮桦 *B1MADS1* 编码蛋白的系统进化分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of *B1MADS1* and related *AP1/SQUA*-like MADS-box genes

MADS-box 基因家族在进化中经历了多次复杂事件, 其中 *AP1/SQUA* 亚家族基因在真双子叶植物分化前经历了 2 次倍增事件, 形成 3 个主要分支 *euAP1*, *AGL79* 和 *euFUL*<sup>[23]</sup>。*AGL79* 和 *euFUL* 类基因具有保守的 *paleoAP1* 基序(或结构域), 被认为是比较原始的类型, 但它们之间的进化关系仍不明确。系统分析结果表明 *B1MADS1* 属于 *AGL79* 这一分支, 与同属的欧洲白桦 *B1MADS4* 亲缘最近, 与切花菊 *CDM41* 聚为一类, 其次与葡萄 *Vitis vinifera* *VFUL-L* 和金鱼草 *DEF28* 等具有较近的亲缘关系。同时 *B1MADS1* 也具有 *paleoAP1* motif, 说明 *B1MADS1* 在进化上属于较原始的类型。另有研究表明: 欧洲白桦 *BpMADS3*, *BpMADS4* 及 *BpMADS5* 基因分别是拟南芥 *AP1/CAL*, *AGL79* 及 *FUL* 基因的直系同源物<sup>[24]</sup>。光皮桦 *B1MADS1* 基因与欧洲白桦 *BpMADS4* 基因具有最近的亲缘关系, 说明 *B1MADS1* 基因也是拟南芥 *AGL79* 基因的直系同源物。

在功能上, 许多研究表明 *AP1/SQUA*-like 亚家族基因在花器官的起始、萼片及叶片的发育中发挥重要的调控功能<sup>[25-26]</sup>。如欧洲白桦 *BpMADS4* 基因在雌雄花序分生组织起始的早期阶段以及分生组织顶端部位、幼嫩苞片初始部位的表达水平较高, 随着发育的进行, 雄花序和苞片中的表达下降, 而雌花序中, 表达会持续至开花后, 且种子形成阶段主要在胚珠中表达<sup>[27]</sup>。值得注意的是, 可能由于可变剪切, 在光皮桦中 *B1MADS1* 基因存在 2 个转录本, 长转录本 *B1MADS1L* 编码缺失 C 末端的 MADS-box 蛋白,

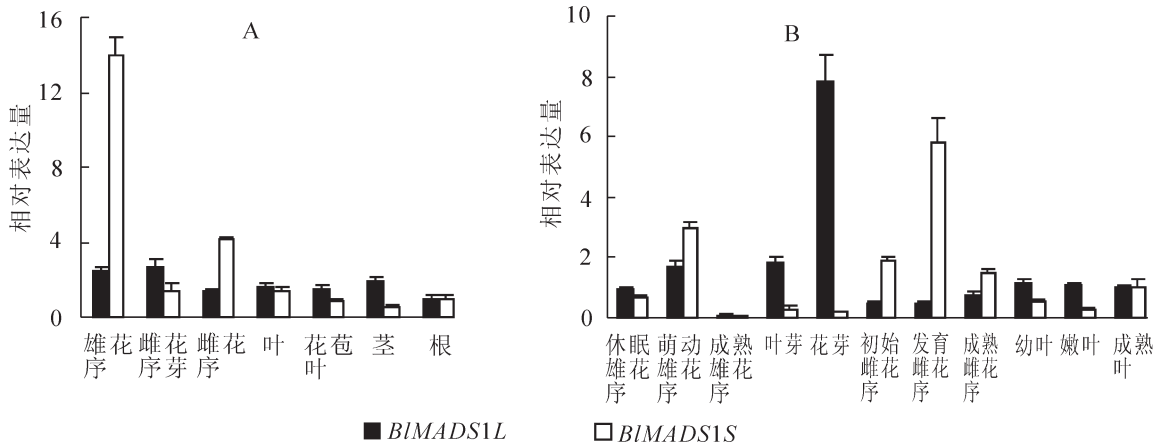
短转录本 *BIMADS1S* 则编码正常的 MADS-box 蛋白。以往的研究通常认为，这种可变剪切的转录本会通过降低正常转录本的浓度，或编码非正常蛋白，起到抑制正常转录本功能的作用<sup>[15]</sup>。本研究的表达分析表明，*BIMADS1* 基因 2 个转录本在光皮桦雌雄花序发育过程中具有的不同表达模式。这 2 个转录本均在萌动雄花序中表达量最高，在休眠和成熟的雄花序中的表达水平则降低，这与欧洲白桦 *BpMADS4* 基因在雄花序中的表达模式较一致；在雌花序发育过程中，*BIMADS1L* 的表达最高峰出现在孕育雌花序的花芽中，而 *BIMADS1S* 的表达峰值则出现在萌动发育中的雌花序中，这与 *BpMADS4* 基因在雌花序中的表达模式存在差异，暗示 *BIMADS1L* 可能在光皮桦雌花序发育启动中起抑制作用，而 *BIMADS1S* 则可能有促进光皮桦雌花序萌动成熟的功能。这些结果说明，光皮桦 *BIMADS1* 基因 2 个转录本的表达可能存在一种协同关系，这种协同作用可能在雌雄花序萌发成熟过程中起重要的调控作用。



FI-1, FI-2, FI-3, MI-1, MI-2, MI-3, L-1, L-2, L-3, FB-1, FB-2 分别表示初始雌花序、发育雌花序、成熟雌花序、休眠雄花序、萌动雄花序、成熟雄花序、幼叶、嫩叶、成熟叶、叶芽、花芽。

图 5 不同发育阶段的 4 种器官

Figure 5 Different developing stages of four organs



A, MI 为雄花序, FB 为雌花序芽, FI 为雌花序, L 为叶子, B 为花苞叶, S 为茎, R 为根; B, MI-1~MI-3 为 3 个不同发育阶段的雄花序, FB-1~FB-2 为 2 个不同发育阶段的雌花序芽, FI-1~FI-3 为 3 个不同发育阶段的雌花序, L-1~L-3 为 3 个不同发育阶段的叶片。

图 6 *BIMADS1* 基因在不同器官和不同发育时期组织中的表达分析

Figure 6 Expression analysis of *BIMADS1* in different organs and tissues from different development stages

#### 4 参考文献

- [1] BECKER A, THEIßEN G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, **29**(3): 464 – 489.
- [2] MARTINEZ-CASTILLA L P, ALVAREZ-BUYLLA E R. Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, **100**(23): 13407 – 13412.
- [3] NAM J, de PAMPHILIS C W, MA H, et al. Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, **20**(9): 1435 – 1447.
- [4] FUJISAWA M, NAKANO T, SHIMA Y, et al. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening [J]. *Plant Cell*, 2013, **25**(2): 371 – 86.

- [5] HEMMIN M N, TREVASKIS B. Make hay when the sun shines: the role of MADS-box genes in temperature-dependant seasonal flowering responses [J]. *Plant Sci*, 2011, **180**(3): 447 – 453.
- [6] NAYAR S, SHARMA R, TYAGI A K, *et al.* Functional delineation of rice *MADS29* reveals its role in embryo and endosperm development by affecting hormone homeostasis [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(14): 4239 – 4253.
- [7] UBI B E, SAITO T, BAI S, *et al.* Characterization of 10 MADS-box genes from *Pyrus pyrifolia* and their differential expression during fruit development and ripening [J]. *Gene*, 2013, **528**(2): 183 – 194.
- [8] PURUGGANAN M D, ROUNSLEY S D, SCHMIDT R J, *et al.* Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family [J]. *Genetics*, 1995, **140**(1): 345 – 356.
- [9] JACK T. Molecular and genetic mechanisms of floral control [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(supp): S1 – S17.
- [10] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, *et al.* *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1992, **69**(5): 843 – 859.
- [11] WELLMER F, RIECHMANN J L. Gene networks controlling the initiation of flower development [J]. *Trends Genet*, 2010, **26**(12): 519 – 527.
- [12] AOKI S, UEHARA K, IMAFUKU M, *et al.* Phylogeny and divergence of basal angiosperms inferred from *APETALA3*-and *PISTILLATA*-like MADS-box genes [J]. *J Plant Res*, 2004, **117**(3): 229 – 244.
- [13] 郑万钧. 中国树木志: 第2卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985: 2124 – 2131.
- [14] 尤卫艳, 黄华宏, 程龙军, 等. 光皮桦 SSR 分子标记体系的建立[J]. 浙江农林大学学报, 2010, **27**(3): 464 – 469. YOU Weiyan, HUANG Huahong, CHENG Longjun, *et al.* An SSR molecular labeling technique system for *Betula luminifera* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2010, **27**(3): 464 – 469.
- [15] 陈争, 姜小凤, 童再康. 光皮桦 EST-SSR PCR 反应体系的优化[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(6): 960 – 965. CHEN Zheng, JIANG Xiaofeng, TONG Zaikang. Optimization of EST-SSR PCR reaction system for *Betula luminifera* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(6): 960 – 965.
- [16] 黄程前, 宋丽青, 童再康, 等. 光皮桦 *BIFTL* 基因的克隆和表达模式[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(3): 343 – 349. HUANG Chengqian, SONG Liqing, TONG Zaikang, *et al.* Cloning and expression analysis of *BIFTL* in *Betula luminifera* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(3): 343 – 349.
- [17] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28**(10): 2731 – 2739.
- [18] SHAN Hongyan, ZHANG Ning, LIU Cuijing, *et al.* Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the *API/SQUA* subfamily of plant MADS-box genes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, **44**(1): 26 – 41.
- [19] SMACZNAK C, IMMINK R G H, ANGENENT G C, *et al.* Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies [J]. *Development*, 2012, **139**(17): 3081 – 3098.
- [20] PARENICOVA L, de FOLTER S, KIEFFER M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(17): 1538 – 1551.
- [21] KYOZUKA J, HARCOURT R, PEACOCK WJ, *et al.* Eucalyptus has functional equivalents of the *Arabidopsis API* gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, **35**(5): 573 – 584.
- [22] GOCAL G F W, KING R W, BLUNDELL C A, *et al.* Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(4): 1788 – 1801.
- [23] AIROLDI C A, DABIES B. Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors [J]. *J Genet Genomics*, 2012, **39**(4): 157 – 65.
- [24] LITT A, IRISH V F. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development [J]. *Genetics*, 2003, **165**(2): 821 – 833.
- [25] MANDEL M A, YANOFSKY M F. The *Arabidopsis AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1* [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1763 – 1771.
- [26] GU Qing, FERRANDIZ C F, YANOFSKY M F, *et al.* The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development [J]. *Development*, 1998, **125**(8): 1509 – 1517.
- [27] ELO A, LEMMETYINEN J, TURUNEN M L, *et al.* Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*) [J]. *Physiol Plantarum*, 2001, **112**(1): 95 – 103.