

桂花 *OfAP1* 基因的克隆及表达分析

蒋琦妮, 付建新, 张超, 董彬, 赵宏波

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: *AP1*(*APETALA1*)基因在植物花分生组织及花器官形成过程中发挥着重要作用。以桂花品种‘堰虹桂’ *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’ 为材料, 根据前期获得的转录组数据中 *AP1* 的序列设计引物, 利用 PCR 技术, 克隆得到约 750 bp 桂花 *AP1* cDNA 序列, 即 *OfAP1* 基因, 其中开放阅读框长为 720 bp(注册号为 MH593222)。氨基酸序列比对发现, 与其他物种的 *AP1* 基因的同源性高达 69%~88%。荧光定量 PCR 结果表明: 在不同组织中, 桂花的 *OfAP1* 基因在花芽中的表达量显著高于其他组织, 根中几乎不表达; 在花芽分化过程中, *OfAP1* 在成花转变及花芽分化初期(花瓣、花萼分化期)表达量较高, 随后呈下降趋势。这说明 *OfAP1* 具有组织表达特异性, 同时在桂花成花转变、花芽分化和发育中有重要作用。图 6 参 26

关键词: 林木育种学; 桂花; *AP1*; 克隆; 表达分析; 花芽分化

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)04-0664-06

cDNA cloning and expression analysis of *OfAP1* in *Osmanthus fragrans*

JIANG Qini, FU Jianxin, ZHANG Chao, DONG Bin, ZHAO Hongbo

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Osmanthus fragrans* is one of the top ten traditional flowers and a common landscaping tree in China. To better understand the function of *AP1* in regulation of *Osmanthus* flowering, the *OfAP1* gene was cloned from the *Osmanthus* cultivator ‘Yanhonggui’, and its function was analyzed through bioinformatics method and real time PCR. Our results showed that the cDNA length of *OfAP1* was 750 bp (GenBank accession No. MH593222), in which the Open Reading Frame length was 720 bp, the amino acid was 239. The *OfAP1* sequence alignment revealed high homology with other species ranging from 69% to 88%. Additionally, expression profiles showed that the expression of *OfAP1* in flower buds was much higher than that in other tissues (root, stem, leaf, leaf bud and flower), and the expression was barely expressed in roots. During the development of flower bud, the *OfAP1* showed higher expression in S1 (calyx and petal differentiation) stage than other stages. Thus, these results suggested that *OfAP1* had a tissue specific expression and played an important role in flowering transformation, flower bud differentiation, and development of *O. fragrans*. And the results of *OfAP1* can lay a foundation for further study of the molecular mechanism of *O. fragrans*. [Ch, 6 fig. 26 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Osmanthus fragrans*; *AP1*; gene cloning; expression analysis; flower bud development

高等植物成花受到自身遗传因素和外界环境因素的共同影响^[1-2]。当植物完成成花诱导, 花器官原基开始分化, 逐渐形成花萼、花瓣、雄蕊和心皮等组织。在这期间, 植物的茎尖分生组织形态发生了很大的变化, 同时成花素 *FT*(*FLOWERING LOCUS T*)的表达量显著增加并参与调控花芽分化^[3]。在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 以及许多物种中已经证实, *FT* 可以通过激活花芽分化组织特异性基因 *AP1*

收稿日期: 2018-08-23; 修回日期: 2018-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501790); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C160004, Q16C160009)

作者简介: 蒋琦妮, 从事桂花成花研究。E-mail: jiangqinini@163.com。通信作者: 赵宏波, 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种等研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

(*APETALA1*) 的表达促使植物完成开花进程^[4]。过表达 *AP1* 基因, 不论在长、短日照下拟南芥都会出现早花表型^[5], 其突变体 *ap1* 则出现明显的晚花表型^[6]。在茎尖分生组织, *AP1* 基因不仅在植物成花诱导的调控网络中起核心作用, 而且也决定花器官的形成。*AP1* 基因是植物 ABCDE 分化模型中的 A 类基因, 控制第一轮花萼和第二轮花被片组织的形成^[7], 同时 *AP1* 也调控 *SEP3* (*SEPALATA3*) 与 *LFY* (*LEAFY*) 基因的表达, 促进花萼和花瓣的分化^[8-9]。另外在拟南芥 *ap1* 突变体研究中发现, *AP1* 突变会引起花器官的异常发育, 如花萼发育成叶片、花瓣缺失等^[10-11]。人们已从多种观赏植物中分离得到了 *AP1* 基因, 并且对多个物种的 *AP1* 基因进行了功能验证和分析。超表达 *AP1* 及其同源基因都能促进开花, 在拟南芥中异源表达百合 *Lilium longiflorum*, 蝴蝶兰 *Phalaenopsis aphrodite* 以及山茶 *Camellia japonica* 的 *AP1* 同源基因都能引起早花现象^[12-14]。同时, 在拟南芥 *AP1* 突变体中异源表达百合, 枇杷 *Eriobotrya japonica* 以及麻疯树 *Jatropha curcas* 中的 *AP1* 基因, 都可以回补其突变体花器官缺陷的性状^[12, 15-16]。桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国十大传统名花之一, 也是常见的园林绿化树种。按照开花习性不同, 可分为秋桂和四季桂, 秋桂仅在每年秋季开花, 花序常为无总梗的聚伞花序^[17]; 关于其成花过程以及花芽分化和发育报道较少。木本植物桂花成花的机制与草本植物拟南芥等有一定差异。为深入了解桂花的成花机制, 有必要分离成花相关基因并展开相关研究。本研究以秋桂品种‘堰虹桂’ *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’ 为材料, 克隆桂花 *AP1* 基因 (*OfAP1*), 并对其序列进行生物信息学分析, 同时运用荧光定量对其组织和时空表达进行分析, 以明确 *OfAP1* 基因的基本特征和表达模式, 为今后桂花的开花分子机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以盆栽‘堰虹桂’为材料, 选取相同株龄且生长一致的植株。取桂花不同组织的样品, 包括根、茎、叶、叶芽、花芽、盛开期的花朵; 同时根据桂花花芽分化进程取叶芽、花序分化期、花萼花瓣分化期、雌雄蕊分化期以及花开放不同阶段圆珠期、铃梗期、初花期、盛花期和盛花末期的样品^[18], 用于基因克隆、组织特异性和时空表达分析。所有材料使用液氮冷冻并于 -80 °C 保存备用。

RNA 提取试剂盒 (RNAprep pure Plant Kit) 购自天根公司 (北京)。反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、胶回收试剂盒、Premix *Taq* 酶、pMD-18T 载体和大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 均购自 Takara 公司 (大连), 运用实时荧光定量 PCR (Applied Biosystems, Foster City, 美国) 分析 *OfAP1* 基因的组织特异性及时空表达变化。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及反转录 按照 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒说明书提取各样品的总 RNA, 并参照 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录酶说明书合成 cDNA 的第一链后, 储存于 -20 °C 备用。

1.2.2 桂花 *OfAP1* 基因的克隆 利用前期转录组测序获得的 *AP1* Unigene 序列, 设计特异性引物 *AP1*-F: 5'-TAGAGTGAGAAAATGGGGAGA-3'; *AP1*-R: 5'-AATACAATCCCTGGCTACTT-3'。以花芽分化期茎尖 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 上下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, Premix *Taq* DNA 10 μ L 和去离子水 7 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 然后进行 35 个循环, 每个循环包括 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 保温 10 min, 4 °C 保存。PCR 反应产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后回收、纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.3 序列生物信息学分析 对获得的基因序列进行生物信息学分析, 其中编码区分析采用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 在线网站 ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 编码蛋白质的保守区段分析采用 NCBI Conserved Domain Search 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 编码区蛋白质特征分析采用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。多序列比对采用软件 DNAMAN, 系统进化树构建采用 Clustal X+MEGA 7.0 软件并选择邻位连接法 (neighbor joining method) 用 Bootstrap 法检验 1 000 次。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 按照 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒的说明书, 检测桂

花 *OfAP1* 基因不同组织以及不同时期的表达情况。*OfAP1* 定量引物为 *qAP1*-F: 5'-GCAGAAGTG-GCTTTGATTG-3'; *qAP1*-R: 5'-GTTTGCTGGTGACTGAGGTT-3'。同时以 *OfACT* 为内参 *qACT*-F: 5'-CC-CAAGGCAAACAGAGAAAAAAT-3'; *qACT*-R: 5'-ACCCCATCACCAGAATCAAGAA-3'^[19]。qRT-PCR 反应体系: 2×SYBR Premix Ex *Taq* II (Thi RNaseH Plus) 10 μL, 上下游定量引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.8 μL, cDNA 2 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, 双蒸水补齐至 20 μL。qRT-PCR 程序如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。3 次生物学重复。反应后根据熔解曲线分析 qRT-PCR 产物的特异性, 并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 桂花 *OfAP1* 基因的克隆

以‘堰虹桂’花芽分化期 cDNA 为模板, 扩增得到约 750 bp 片段 (图 1), 其开放阅读框长为 720 bp, 编码 239 个氨基酸 (图 2)。该基因片段具有 MADS-box 基因的保守区, 在 NCBI 上进行 BLASTX 在线分析, 发现该序列与芝麻 *Sesamum indicum* (AIS82596.1), 葡萄 *Vitis vinifera* (ACZ26528.1) 和油橄榄 *Olea europaea* (XP_022878350.1) 等中 *AP1* 基因的同源性最高, 命名为 *OfAP1*, 并在 GenBank 注册, 登录号为 MH593222。

2.2 桂花 *OfAP1* 基因的氨基酸序列分析

OfAP1 蛋白氨基酸序列运用 NCBI 在线 CDD (Conserved Domain Database) 分析发现, *OfAP1* 具有典型的 MEF2_like MADS 结构域和 K-box 结构域, MADS 结构域位于 N 端第 2~74 位氨基酸, K-box 结构域位于第 90~168 位氨基酸 (图 2)。*OfAP1* 蛋白的分子式为 C₁₁₉₉H₁₉₄₁N₃₄₁O₃₆₈S₁₆, 其相对分子质量为 27 534.62, 理论等电点为 8.4。负电荷残基总数 (天冬氨酸 Asp+ 谷氨酸 Glu) 为 32, 正电荷残基总数 (精氨酸 Arg+ 赖氨酸 Lys) 为 35。在组成 *OfAP1* 蛋白的 20 种氨基酸中, 亮氨酸 (Leu) 所占比例最高, 为 11.7%, 其次为谷氨酸 (Glu), 占 10.0%, 色氨酸 (Trp) 所占比例最低, 为 0.8%。预测亲水性指数 (GRAVY) 为 -0.665, 表明 *OfAP1* 具有较好的亲水性。

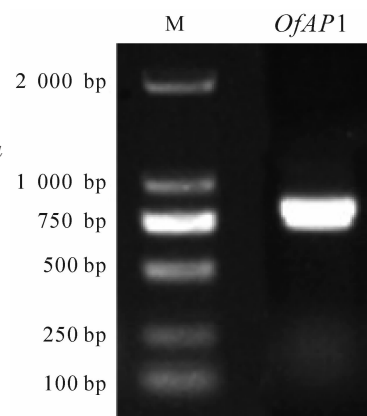


图 1 桂花 *OfAP1* 电泳图

Figure 1 PCR products of *OfAP1*

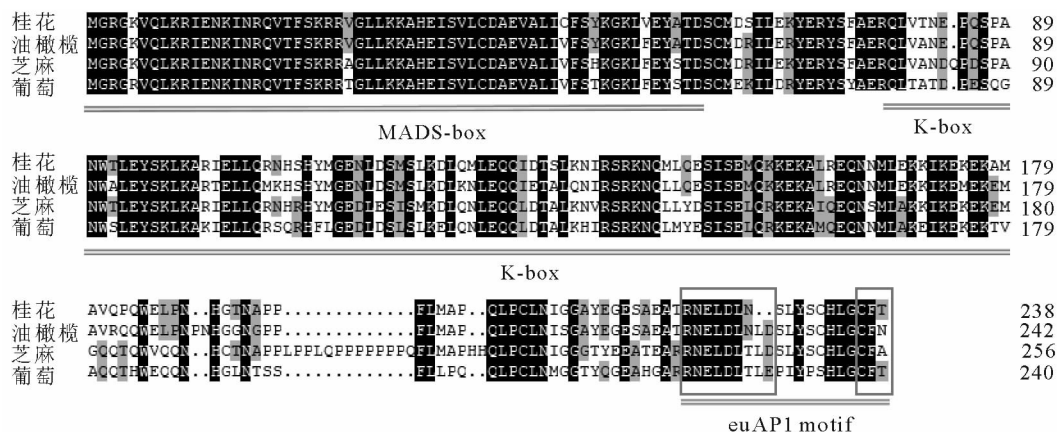


图 2 桂花 *OfAP1* 氨基酸序列比对

Figure 2 Comparative analysis of *OfAP1* protein sequence

采用 GOR4 软件对 *OfAP1* 蛋白二级结构预测发现, *OfAP1* 蛋白二级结构由 α 螺旋、伸展链和无规则卷曲组成, 其中, α 螺旋 (Hh) 占 56.49%, β 折叠 (Ee) 占 10.46%, 无规则卷曲 (Cc) 占 33.05%。同时采用 Phyre 2 在线工具对 *OfAP1* 蛋白三级结构进行预测, *OfAP1* 有 3 个典型的 α 螺旋和 2 个 β 折叠 (图 3)。NetPhos 2.0 Server 预测结果表明: *OfAP1* 蛋白序列中存在 11 个潜在的磷酸化位点, 包括 6 个 Ser 位点 (22Ser, 61Ser, 74Ser, 87Ser, 110Ser, 121Ser, 135Ser, 150Ser, 216Ser) 和 1 个 Thr 位点 (220Thr)。NetNGlyc 1.0 Server 预测结果表明: *OfAP1* 蛋白存在 1 个潜在的 N-糖基化位点, 90Asn。

2.3 桂花 *OfAP1* 系统进化关系分析

为了分析 *OfAP1* 基因与其他物种中 *AP1* 基因的系统进化关系，采用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树(图 4)。单子叶植物(如短柄草 *Brachypodium distachyon*，水稻 *Oryza sativa*，玉米 *Zea mays*)和双子叶植物可以明显地分为 2 个大类。桂花 *OfAP1* 与芝麻，豇豆 *Vigna unguiculata*，枇杷，印加果 *Plukenetia volubilis*，麻疯树，葡萄，芍药 *Paeonia lactiflora*，柑橘 *Citrus sinensis* 以及拟南芥中的 *AP1* 基因聚在一起，说明这些基因亲缘关系较近且功能具有一定的相似性。

2.4 桂花 *OfAP1* 基因的组织特异性与时空表达分析

为明确 *OfAP1* 基因在桂花不同组织以及花芽分化不同时期的表达情况，对不同组织和器官(根、茎、叶、叶芽、花芽以及花)及不同发育时期的样品进行荧光定量 RT-PCR 分析。结果表明：*OfAP1* 基因在花芽中的表达量最高，其次为叶，在茎中的表达比较弱，在根中几乎不表达(图 5)。同时，与叶芽时期相比，*OfAP1* 基因在分化初期(即花原基的形成以及花萼花瓣分化期)表达量最高，随后呈下降趋势(图 6)，到花开放阶段表达量均较低。

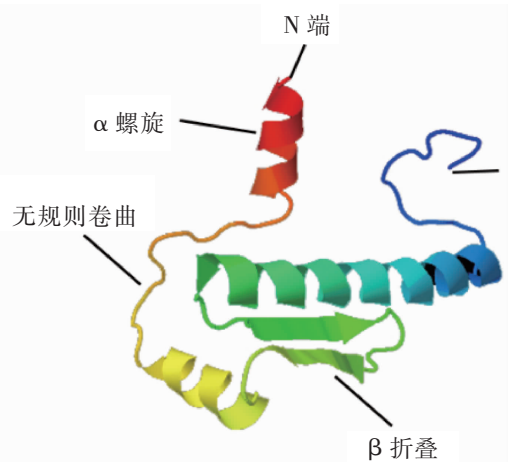


图 3 桂花 *OfAP1* 蛋白的三级结构预测
Figure 3 Tertiary structure prediction for *OfAP1* protein

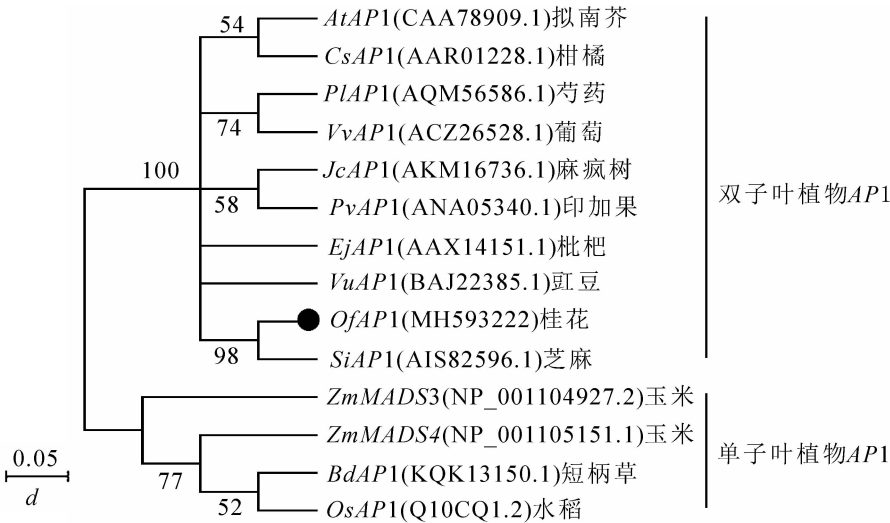


图 4 桂花 *OfAP1* 的系统进化树
Figure 4 Phylogenetic tree based on *OfAP1* gene

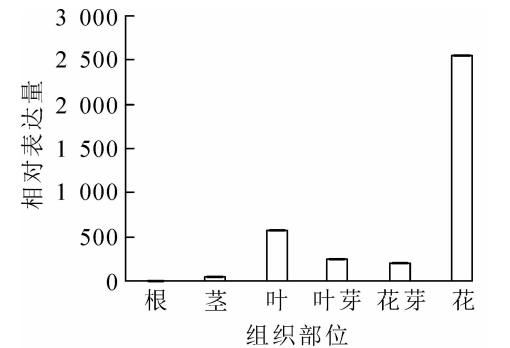


图 5 *OfAP1* 基因在不同组织中的表达量
Figure 5 Expression of *OfAP1* gene in different tissues

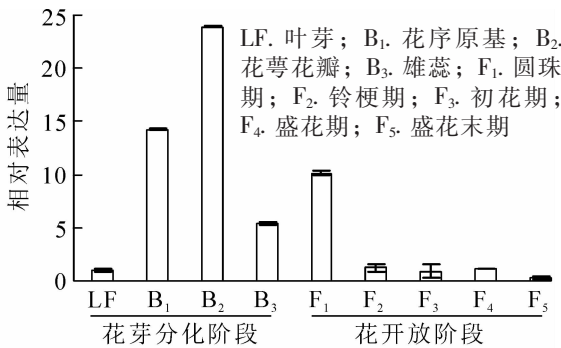


图 6 *OfAP1* 基因在‘堰虹桂’成花及花开放过程的表达量
Figure 6 Expression pattern of *OfAP1* in flowers of different stages

3 讨论

AP1 及其同源基因已在多个物种中克隆得到, 但桂花中的 *AP1* 至今没有相关报道。本研究克隆得到 *OjAP1* 基因, 发现其与芝麻、葡萄以及油橄榄等 *AP1* 基因高度相似, *OjAP1* 氨基酸序列含有高度保守的 MEF2_like MADS 结构域和次级保守的 K-box 结构域以及可变 C, MADS 结构域具有结合 DNA、蛋白质二聚化以及与其他因子结合的功能; K-box 结构域的蛋白二级结构为 3 个 α 螺旋, 具有介导蛋白-蛋白之间的相互作用^[20]。*AP1* 基因 C 末端的变化较大, 但是不同类的 MADS-box 基因常含有一些保守的基序(motif), 这些基序在蛋白复合体的形成和转录激活中起重要作用^[21]。

开花是植物重要的发育阶段, 是多条基因网络共同调控的复杂过程^[2]。*AP1* 基因是植物特有的 MIKCC-Type MADS-box 基因, 既参与花分生组织的形成, 又是花器官形成的重要基因, 在植物成花中起关键调控作用^[3]。根据在模式植物拟南芥中的研究, *AP1* 是花分生组织形成的标志物, 成花整合基因 *FT* 和 *SOC1* 能够激活其表达并使其参与对成花抑制基因 *TFL1* 基因的拮抗, 促进花分生组织的形成。在花器官发育中, *AP1* 一方面通过促进 *AP3* 和 *PI* 的表达诱导花瓣和雄蕊的发育, 另一方面受到 *AG* 基因的抑制作用控制萼片和花瓣的发育^[22]。在百合中 *AP1* 的同源基因 *LMADS5/6* 转基因拟南芥后发现其能够造成早花, 并且花器官中萼片变成心皮状, 花瓣变成雄蕊状结构^[12]; 同样地, 在洋桔梗 *Eustoma grandiflorum* 中超表达 *AP1* 发现: 转基因植株花期提前, 部分花瓣出现雄蕊类似的结构, 进一步突变体互补实验表明: *AP1* 基因对花瓣形成, 尤其是第 2 轮花被片的发育有重要作用^[23]。在建兰 *Cymbidium ensifolium*, 芍药以及菊花 *Chrysanthemum morifolium* 等中, *AP1* 基因在花芽中的表达量显著高于其他器官组织, 尤其在花芽分化的初期阶段^[24-26]。在桂花中, *OjAP1* 在花芽中有较高的表达, 其在花芽分化初期表达量显著上调, 尤其是成花转变以及花瓣、花萼分化时期, 而当完成花萼花瓣分化后, 表达量则显著下调。这充分说明桂花 *OjAP1* 基因参与了桂花成花转变和花瓣、花萼等器官分化, 但其具体作用机制还有待进一步通过转化实验加以验证。

4 参考文献

- [1] 周玉萍, 陈琼华, 黄小玲, 等. 拟南芥开花时间调控的分子基础[J]. 植物学报, 2014, **49**(4): 469 – 482.
ZHOU Yuping, CHEN Qionghua, HUANG Xiaoling, et al. Molecular basis of flowering time regulation in *Arabidopsis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2014, **49**(4): 469 – 482.
- [2] FORNARA F, de MONTAIGU A, COUPLAND G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2010, **141**(3): 550 – 550.
- [3] HUANG T, BÖHLENIUS H, ERIKSSON S, et al. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering [J]. *Science*, 2005, **309**(5741): 1694 – 1696.
- [4] LIU Lu, ZHU Yang, SHEN Lisha, et al. Emerging insights into florigen transport [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, **16**(5): 607 – 613.
- [5] MANDEL M A, YANOFSKY M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1995, **377**(6549): 522.
- [6] PUTTERILL J, LAURIE R, MACKNIGHT R. It's time to flower: the genetic control of flowering time [J]. *Bioessays*, 2004, **26**(4): 363 – 373.
- [7] MANDEL M A, GUSTAFSON-BROWN C, SAVIDGE B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, **360**(6401): 273.
- [8] 戚晓利, 卢孟柱. 拟南芥 *APETALA1* 基因在花发育中的网络调控及其生物学功能[J]. 中国农学通报, 2011, **27**(8): 103 – 107.
QI Xiaoli, LU Mengzhu. Regulation network and biological roles of *APETALA1* of *Arabidopsis thaliana* in flower development [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, **27**(8): 103 – 107.
- [9] KAUFMANN K, WELLMER F, MUINO J M, et al. Orchestration of floral initiation by *APETALA1* [J]. *Science*, 2010, **328**(5974): 85 – 89.
- [10] IRISH V F, SUSSEX I M. Function of the *APETALA1* gene during *Arabidopsis* floral development [J]. *Plant Cell*,

- 1990, **2**(8): 741 – 753.
- [11] BOWMAN J L, ALVAREZ J, WEIGEL D, *et al.* Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes [J]. *Development*, 1993, **119**(3): 721 – 743.
- [12] CHEN Mingkun, LIN Ichun, YANG Changhsien. Functional analysis of three lily (*Lilium longiflorum*) *APETALA1*-like MADS box genes in regulating floral transition and formation [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, **49**(5): 704 – 717.
- [13] LIU Yuexue, KONG Jin, LI Tianzhong, *et al.* Isolation and characterization of an *APETALA1*-like gene from pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, **31**(4): 1031 – 1039.
- [14] SUN Yingkun, FAN Zhengqi, LI Xinlei, *et al.* The *APETALA1* and *FRUITFUL* homologs in *Camellia japonica* and their roles in double flower domestication [J]. *Mol Breed*, 2014, **33**(4): 821 – 834.
- [15] LIU Yuexue, SONG Huwei, LIU Zongli, *et al.* Molecular characterization of loquat *EjAP1* gene in relation to flowering [J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, **70**(3): 287 – 296.
- [16] TANG Mingyong, TAO Yanbin, XU Zengfu. Ectopic expression of *Jatropha curcas APETALA1* (*JcAP1*) caused early flowering in *Arabidopsis*, but not in *Jatropha* [J]. *Peer J*, 2016, **4**: e1969. doi: 10.7717/peerj.1969.
- [17] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志[M]. 浙江: 浙江科学技术出版社, 2008: 56.
- [18] 王英, 张超, 付建新, 等. 桂花花芽分化和花开放研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(2): 340 – 347.
- [18] WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, *et al.* Progress on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
- [19] 付建新, 张超, 王艺光, 等. 桂花组织基因表达中荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(5): 727 – 733.
- [19] FU Jianxin, ZHANG Chao, WANG Yiguang, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) normalization in the gene expression of sweet osmanthus tissues [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
- [20] THEISSEN G, BECKER A, DI ROSA A, *et al.* A short history of MADS-box genes in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **42**(1): 115 – 149.
- [21] NG M, YANOFSKY M F. Function and evolution of the plant MADS-box gene family [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, **2**(3): 186 – 195.
- [22] LIU Chang, XI Wanyan, SHEN Lisha, *et al.* Regulation of floral patterning by flowering time genes [J]. *Dev Cell*, 2009, **16**(5): 711 – 722.
- [23] CHUANG Tienhsin, LI Kunhung, LI Peifang, *et al.* Functional analysis of an *APETALA1*-like MADS box gene from *Eustoma grandiflorum* in regulating floral transition and formation [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2018, **12**(2): 1 – 11.
- [24] 吴菁华, 吴少华, 杨超, 等. 建兰 *AP1* 基因的克隆、表达及其与 MADS-box 转录因子相互作用的分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(10): 1935 – 1942.
- [24] WU Jinghua, WU Shaohua, YANG Chao, *et al.* Cloning and expression analysis on *AP1* homologous gene from *Cymbidium ensifolium* and interaction analysis between *AP1* and MADS-box transcription factors [J]. *Acta Horti Sin*, 2013, **40**(10): 1935 – 1942.
- [25] 吴彦庆, 葛金涛, 陶俊. 芍药花分生组织决定基因(*AP1*)克隆、序列分析及其在不同发育时期花瓣中的表达变化规律[J]. 农业生物技术学报, 2015, **23**(12): 1559 – 1567.
- [25] WU Yanqing, GE Jintao, TAO Jun. cDNA cloning, sequence analysis and tissue expression detection of *APETALA1* gene (*AP1*) in *Paeonia lactiflora* Pall. petals of different development stages [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 2015, **23**(12): 1559 – 1567.
- [26] 梁芳, 黄萍, 袁秀云, 等. 菊花 *CmAP1* 基因克隆及其植物表达载体构建[J]. 南方农业学报, 2017, **48**(6): 952 – 959.
- [26] LIANG Fang, HUANG Ping, YUAN Xiuyun, *et al.* Cloning of *CmAP1* gene from *Chrysanthemum morifolium* and establishment of its plant expression vector [J]. *J South Agric*, 2017, **48**(6): 952 – 959.