

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2019.50602

费越, 夏胜应, 熊海燕, 刘志雄. 蕙兰 *CyfaSTK* 基因的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(5): 602-609Fei Y, Xia SY, Xiong HY, Liu ZX. Cloning and expression analysis of the *CyfaSTK* gene from *Cymbidium faberi*[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(5): 602-609

蕙兰 *CyfaSTK* 基因的克隆与表达分析

费越¹, 夏胜应¹, 熊海燕², 刘志雄^{1*}

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025; 2. 江陵县住房和城乡建设局, 湖北江陵 434100)

摘要: 采用同源克隆的方法, 从蕙兰 (*Cymbidium faberi* Rolfe) 花芽中克隆获得 *CyfaSTK* 基因的 cDNA 序列, 并对其进行生物信息学分析及基因表达分析。结果显示, 该基因全长 843 bp, 其中开放阅读框 (ORF) 长 705 bp, 共编码 234 个氨基酸和 1 个终止密码子。同源蛋白序列比对及分子系统发育分析结果表明, *CyfaSTK* 蛋白属于 D 类 MADS-box 转录因子 STK-like 进化系, 含有 MADS、I、K 和 C 等 4 个结构域, 其 C 末端转录激活区含有 2 个保守的基元: AG motif I 和 AG motif II, 此外, 还具有一个在天门冬目植物中相对保守的基元 MD motif。基因表达的组织特异性分析结果显示: 蕙兰 *CyfaSTK* 基因在花萼、花瓣、唇瓣、药帽、子房中均有表达, 但在叶片中不表达, 其中在子房中的表达量与其他组织相比, 差异达到极显著水平; *CyfaSTK* 在花芽经过休眠后的萌动期表达量最高, 且在开花当天该基因表达量有上升趋势。研究结果表明 *CyfaSTK* 基因不仅参与调控蕙兰花器官的发育过程, 且对子房及合蕊柱的正常发育具有重要作用。

关键词: 蕙兰; 花发育; MADS-box 基因; *CyfaSTK* 基因

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)05-0602-08

Cloning and expression analysis of the *CyfaSTK* gene from *Cymbidium faberi*

Fei Yue¹, Xia Sheng-Ying¹, Xiong Hai-Yan², Liu Zhi-Xiong^{1*}

(1. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China;

2. Jiangling County Housing and Urban-Rural Development Bureau, Jiangling, Hubei 434100, China)

Abstract: The cDNA sequence of the *CyfaSTK* gene (GenBank accession number: MH917915.1) was cloned from the flower bud of *Cymbidium faberi* Rolfe by homologous cloning. Results showed that the gene was 843 bp in length and the open reading frame (ORF) was 705 bp long, encoding a total of 234 amino acids and a stop codon. Molecular phylogenetic analysis and homologous protein comparison showed that the *CyfaSTK* protein belonged to the transcription factor STK-like evolution line of the AG subfamily of the D-class MADS-box gene family, which contained four distinct domains of MADS, I, K, and C terminal. The C terminal transcriptional activation region contained two conserved motifs: i.e., AG motif I and AG motif II. In addition, there was also a relatively conserved MD motif in Asparagales plants. Tissue specificity analysis showed that the *C. faberi CyfaSTK* gene was expressed in sepals, petals, lips, anther caps, gynostemium, and ovaries, but not in juvenile leaves. Expression of the *C. faberi CyfaSTK* gene in the ovary was significantly higher than that in other

收稿日期: 2019-05-12, 退修日期: 2019-07-02。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101202); 长江大学优秀硕士学位论文培育计划(YS2018049)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31101202) and Excellent Master Dissertation Cultivation Program of Yangtze University (YS2018049)。

作者简介: 费越(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为园林植物遗传发育与应用(E-mail: 201771409@yangtzeu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zxliu77@yahoo.com)

tissues. Among the dynamic changes in the flower bud at different developmental stages, the expression of *CyfaSTK* was the highest at the germination stage after dormancy and increased on the day of flowering. These results suggest that the D-class *CyfaSTK* gene not only regulates organ development in *C. faberi*, but also plays an important role in the normal development of the gynostemium and ovary.

Key words: *Cymbidium faberi*; Flower development; MADS-box gene; *CyfaSTK* gene

蕙兰 (*Cymbidium faberi* Rolfe) 是兰科兰属重要的观赏植物, 其花器官形态、颜色和数量多变, 深受人们喜爱。蕙兰的栽培历史悠久, 逐渐形成了其独特的赏兰和养兰文化。随着经济的发展和人居环境的改善, 人们对新、奇、特的兰花新品种的需求量不断上升, 相对于蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite* Rchb. F.)、文心兰 (*Oncidium altissimum* (Jacq.) Sw.) 和兜兰 (*Cypripedium corrugatum* Franch.) 等洋兰而言, 蕙兰的育种工作相对滞后。了解植物花与果的发育规律与调控机制, 对于利用有性杂交技术、基因工程手段创造植物新品种具有重要的科学意义。

在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, *SEEDSTICK* (*STK*) 基因编码了一个 MADS-box 转录因子, 其仅在胚珠和种子中表达, 参与子房和胚珠的发育调控; *STK* 基因在维持珠柄的正常形态, 促进角果成熟和开裂中起非常重要的作用^[1, 2]。前人对洋兰的花、果发育调控的研究中发现, 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 植物的 *STK-like* 基因 *PhalAG2* 仅在花器官中表达, 其在唇瓣、合蕊柱和胚珠中具有明显的转录信号^[3]; 球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum* Rchb. f.) 的 *STK* 同源基因 *DthyrAG2* 在成熟的花芽、蕊喙、合蕊柱和发育中的胚珠中均有明显表达^[4]。兰科植物中的 *STK* 同源基因与拟南芥 *STK* 基因在表达模式上具有明显差异; 即使在兰科植物中, *STK* 同源基因间的表达模式也具有一定的差别。

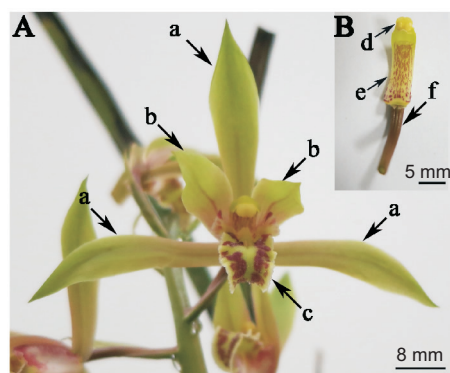
蕙兰是我国传统名花, 本研究在克隆蕙兰 *STK* 同源基因的基础上, 进一步对该基因在花发育过程中表达的组织特异性和表达量的动态变化进行分析, 以期阐明蕙兰花和蒴果发育的分子调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以种植于长江大学西校区种质资源圃的蕙兰

为实验材料。蕙兰种植于陶盆 (直径 25.5 cm、高 26 cm) 中, 待花芽分化后, 采集蕙兰不同发育时期的新鲜花芽, 采用游标卡尺测量其长度和直径; 另取当天开放的花朵及少量幼叶, 剥离花萼、花瓣、唇瓣、药帽、合蕊柱和子房 (图 1), 所有实验材料置于液氮中速冻, 于 -80°C 超低温冰箱保存、备用。



A: 花器官正面观; B: 合蕊柱正面观。a: 花萼; b: 花瓣; c: 唇瓣; d: 药帽; e: 合蕊柱; f: 子房。
A: Front view showing flower organs; B: Front view showing gynostemium. a: Sepals; b: Petals; c: Lip; d: Anther cap; e: Gynostemium; f: Ovary.

图 1 蕙兰花的结构

Fig. 1 Structure of a *Cymbidium faberi* flower

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 EASYspin 植物 RNA 提取试剂盒提取上述蕙兰不同组织的总 RNA 并反转录合成 cDNA^[5]。

1.3 *CyfaSTK* 基因克隆和编码转录因子分析

参照 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中已公布的蕙兰近缘种建兰 (*Cymbidium ensifolium* (L.) Sw) 的 *SEEDSTICK* (*STK*) 同源基因序列 (序列号: JN613150.1), 在其 5' 非翻译区 (5'-UTR) 的保守区设计扩增蕙兰 *CyfaSTK* 基因全长的特异性引物 GSPSTKF (5'-CAACGACGAGATG-CACCTTCTCTG-3')。采用 3'-full RACE Core Set Ver. 2.0 kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒, 通过 3'-RACE 技术, 克隆蕙兰 *CyfaSTK* 基因, 扩增方法参照试剂盒说明书进行。反应体系为 25 μL , PCR 反应程序为: 94°C 变性 5 min; 94°C 预变性 45 s,

57℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。目的片段回收后连接到 pTOPO-T 载体(艾德莱, 北京), 经转化、阳性克隆鉴定和测序, 获得蕙兰 *CyfaSTK* 基因的全长序列。采用 ExPASy 在线软件(<https://www.expasy.org/>)预测基因的开放阅读框(ORF), 编码蛋白的分子量和等电点。

1.4 分子系统发育分析和转录因子结构分析

将蕙兰 *CyfaSTK* 基因 ORF 编码的转录因子在 NCBI 中进行 BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)同源搜索。本研究选取了 23 种植物, 共 30 个 C/D 类 MADS 转录因子(表 1), 采用 MEGA5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)构建分子系统发育树(Bootstrap = 1000)。同时选取文心兰 OMADS2、球花石斛 *DthyrAG2*、小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. f.) PeMADS7、麝香百合 (*Lilium longiflorum* Thunb.) LMADS2、拟南芥 STK、连香树 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.) CejaAGL11、桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch.) PPERSTK、苹果

表 1 用于序列比对和系统发育分析的物种信息
Table 1 Information on sequences selected for alignment and phylogenetic analysis

科 Family	种 Species	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	系 Lineage
兰科 Orchidaceae	建兰 <i>Cymbidium ensifolium</i> (L.) Sw.	CeMADS1	ADP00515.1	C
		CeMADS2	ADP00516.1	C
	文心兰 <i>Oncidium altissimum</i> (Jacq.) Sw.	OMADS4	AIJ29176.1	C
		OMADS2	AIJ29175.1	D
	球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i> Rchb. f.	DthyrAG1	AAY86364.1	C
		DthyrAG2	AAY86365.1	D
	木石斛 <i>Dendrobium crumenatum</i> Sw.	DecrAG1	AAZ95250.1	C
	意大利红门兰 <i>Orchis italica</i> Poir.	OitaAG	AFU81322.1	C
	小兰屿蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis equestris</i> (Schauer) Rchb. f.	PeMADS7	AFI61557.1	D
		PeMADS1	AAL76415.1	C
蕙兰 <i>Cymbidium faberi</i> Rolfe	CyfaSTK	QDF44725.1	D	
风信子科 Hyacinthaceae	风信子 <i>Hyacinthus orientalis</i> L.	HoMADS1	AAF08830.2	D
百合科 Liliaceae	麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i> Thunb.	LMADS2	AAS01766.1	D
		LMADS10	AIJ29174.1	C
禾本科 Poaceae	水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	OsMADS58	BAE54300.1	C
		OsMADS3	AAA99964.1	C
十字花科 Brassicaceae	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	STK	OAO98566.1	D
连香树科 Cercidiphyllaceae	连香树 <i>Cercidiphyllum japonicum</i> Sieb. et Zucc.	CejaAGL11	ASY97762.1	D
茄科 Solanaceae	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i> Vilm.	FBP11	CAA57445.1	D
		FBP7	CAA57311.1	D
蔷薇科 Rosaceae	桃 <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	PPERSTK	ABQ85556.1	D
	苹果 <i>Malus domestica</i> Mill.	MDMADS10	CAA04324.1	D
葡萄科 Vitaceae	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	VVMADS5	AAM21345.1	D
罂粟科 Papaveraceae	博落木 <i>Bocconia frutescens</i> L.	BofrAG	AOC50669.1	C
	血根草 <i>Sanguinaria canadensis</i> L.	ScAG	AAS45685.1	C
小檗科 Berberidaceae	涝峪小檗 <i>Berberis gilgiana</i> Fedde	BgilAG	AAS45694.1	C
领春木科 Eupteleaceae	领春木 <i>Euptelea pleiospermum</i> Hook. f. et Thoms.	EuplAG1	ADC79698.1	C
木通科 Lardizabalaceae	木通 <i>Akebia quinata</i> (Houtt.) Decne.	AkquAG	AAS45695.1	C
	牛姆瓜 <i>Holboellia grandiflora</i> Reaub.	HogrAG1	AFL03397.1	C
	猫儿屎 <i>Decaisnea insignis</i> (Griff.) Hook. f. et Thoms.	DEinAG	AFL03394.1	C

(*Malus domestica* Mill.) MDMADS10 和 蕙 兰 *CyfaSTK*, 共 9 种 已知 结构 域 的 D 类 MADS 转录因子, 采用 Bioedit 7.0.9 软件的 ClustalW 程序 (Bootstrap = 1000), 通过 蛋白 序列 同源 比对 对 蕙 兰 *CyfaSTK* 转录 因子 的 结构 域 进行 分析。

1.5 *CyfaSTK* 基因的表达模式分析

选取 蕙 兰 长度 分别 为 5 (花 芽 分化 期)、8 (休眠 期)、10 (萌 动 期)、15、20、25 mm 的 花 芽 和 开 花 当 天 的 花 朵, 提 取 总 RNA 并 合 成 cDNA。采 用 实 时 荧 光 定 量 PCR 技术, 检 测 *CyfaSTK* 基 因 在 花 芽 不 同 分 化 期 的 表 达 量; 同 时, 检 测 该 基 因 在 蕙 兰 幼 叶、花 萼、花 瓣、唇 瓣、药 帽、合 蕊 柱 和 子 房 共 7 种 组 织 中 的 表 达 特 异 性。qPCR 分析 检 测 采 的 引 物 为: qCyfa-STKF (5'-AGGGC-CAAGCTAGCAGAGAG-3') 和 qCyfaSTKR (5'-GATGGTGCGAGTAAGGAGGC-3'); 以 蕙 兰 的 持 家 基 因 *Cyfaactin* (序 列 号: JN177719.1) 为 内 参, 扩 增 引 物 为: qCyfaactinF (5'-TGAAGAT-ACTTACTGAGAGAGGC-3') 和 qCyfaactinR (5'-GTCTCGAGCTCCTGTTTCATAATC-3')。qPCR 参 照 ChamQ™-SYBR qPCR Master Mix 试 剂 盒 (诺 唯 赞, 南 京) 说 明 书 的 程 序 进 行, 设 3 个 生 物 学 重 复。采 用 SPSS 11.0 软 件 分 别 对 *CyfaSTK* 基 因 的 表 达 量 进 行 差 异 显 著 性 分 析。

2 结果与分析

2.1 蕙兰 *CyfaSTK* 基因的克隆和编码转录因子的理化性分析

序列分析结果显示, 蕙兰 *CyfaSTK* (GenBank 登录号为: MH917915.1) 基因的 cDNA 序列全长 843 bp (图 2), 包含 105 bp 的 5'-UTR、705 bp 的 ORF 和 33 bp 的 3'-UTR 区, 编码一个由 234 个

氨基酸残基组成的 MADS-box 转录因子。*CyfaSTK* 蛋白的相对分子质量为 26.99 kD, 理论等电点为 8.90, 该转录因子共由 19 种氨基酸组成, 其中亮氨酸 24 个, 占比最高 (10.3%)。该蛋白为亲水性蛋白。

分子系统发育分析结果表明 (图 3), 蕙兰 *CyfaSTK* 属兰科植物 MADS-box 家族中 STK 进化系转录因子。其与文心兰、小兰屿蝴蝶兰和球花石斛的 STK 同源蛋白聚类于兰科植物的小进化分枝, 且与风信子、麝香百合的 6 个 STK 同源蛋白共同聚类于单子叶植物 D 类基因的 STK 进化系。其中, 蕙兰 *CyfaSTK* 蛋白与文心兰的亲缘关系最近, 与其他双子叶植物亲缘关系较远。

2.2 *CyfaSTK* 蛋白序列比对与结构分析

蛋白序列比对和结构分析结果显示 (图 4), 蕙兰 *CyfaSTK* 蛋白是典型的植物 MIKC 型 MADS-box 转录因子^[6-8]。MADS 结构域 (3 ~ 59) 位于 *CyfaSTK* 转录因子 N 端, 由 57 个高度保守的氨基酸残基组成; 次级保守的 K 结构域 (93 ~ 174) 由 81 个氨基酸序列组成, 其包含有 K1 (93 ~ 114)、K2 (127 ~ 141) 和 K3 (149 ~ 174); I 间隔区 (60 ~ 92) 位于 MADS 结构域和 K 结构域之间, 是一段由 33 个氨基酸组成的保守性较低的序列; 最不保守的 C 末端转录激活区 (175 ~ 236) 位于多肽链的羧基端, 包含 61 个氨基酸序列残基。此外, 蕙兰 *CyfaSTK* 氨基酸序列在 C 端包含两个 AG 亚家族的保守基元^[9]: AG motif I (189 ~ 197) 和 AG motif II (215 ~ 227), 并且还存在于一个与单子叶植物 D-class 蛋白有关^[10]的位于 AG 基序 II 下游的 9 个氨基酸基序 MD motif。其中 MD motif 在天冬目 (Asparagales) 中兰科和风信子科植物中较为保守。研究结果说明蕙兰 *CyfaSTK* 属于 D 类 MADS-box 基因。

2.3 *CyfaSTK* 基因在蕙兰中的表达模式分析

CyfaSTK 基因表达的组织特异性分析结果显示 (图 5), 该基因在蕙兰的花萼、花瓣、唇瓣、药帽和子房等花器官中均有表达, 但在营养器官叶片中不表达。且在子房中的表达量最高, 与其他花器官相比, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

进一步分析 *CyfaSTK* 基因在花芽分化不同时期表达量的动态变化 (图 6), 发现在蕙兰花芽分化过程中, *CyfaSTK* 基因的表达量呈先升高后降低再升

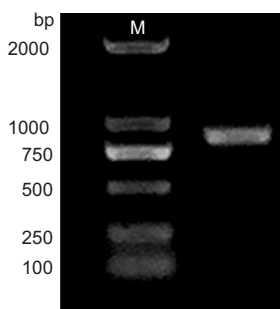


图 2 蕙兰 *CyfaSTK* 基因的扩增片段

Fig. 2 Cloning of *CyfaSTK* gene from *Cymbidium faberi*

高的变化趋势。在花芽分化早期至花芽高温休眠前，随着花芽的发育和长度的增加，花芽中该基因的表达量持续上升；随着花芽休眠的打破，萌动发育至 10 mm 时，*CyfaSTK* 基因表达量达到最高，显著高于花芽分化后期（花芽长 15、20、25 mm 时）以及

开花当天的表达量 ($P < 0.05$)。随着花芽继续发育，*CyfaSTK* 基因表达量逐渐下降，直至花芽发育成熟至开花前 (25 mm)，表达量降至最低，但此时的表达量与萌动后期花芽的表达量相比无显著差异，至开花时，该基因表达量有微弱的上调。

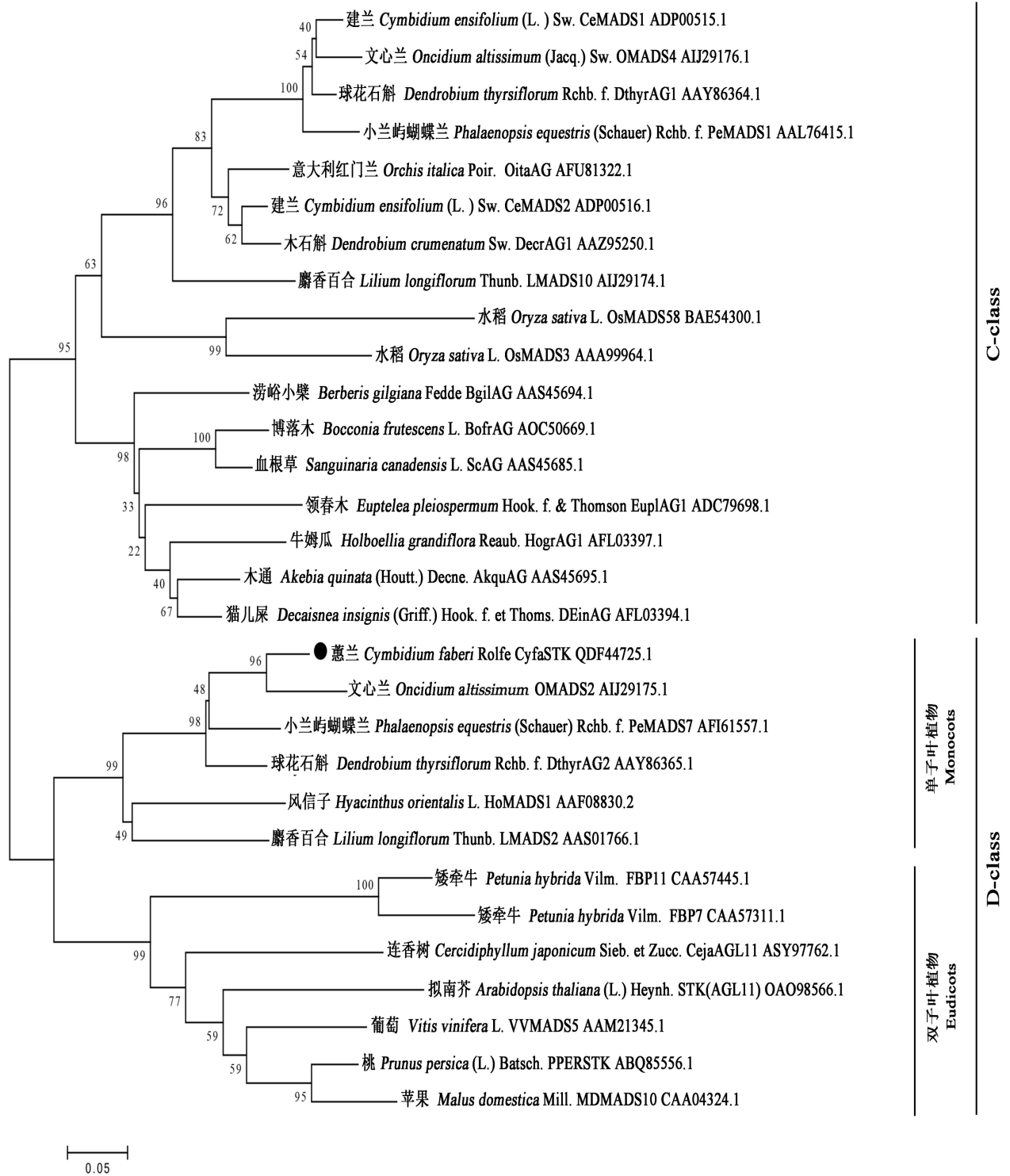
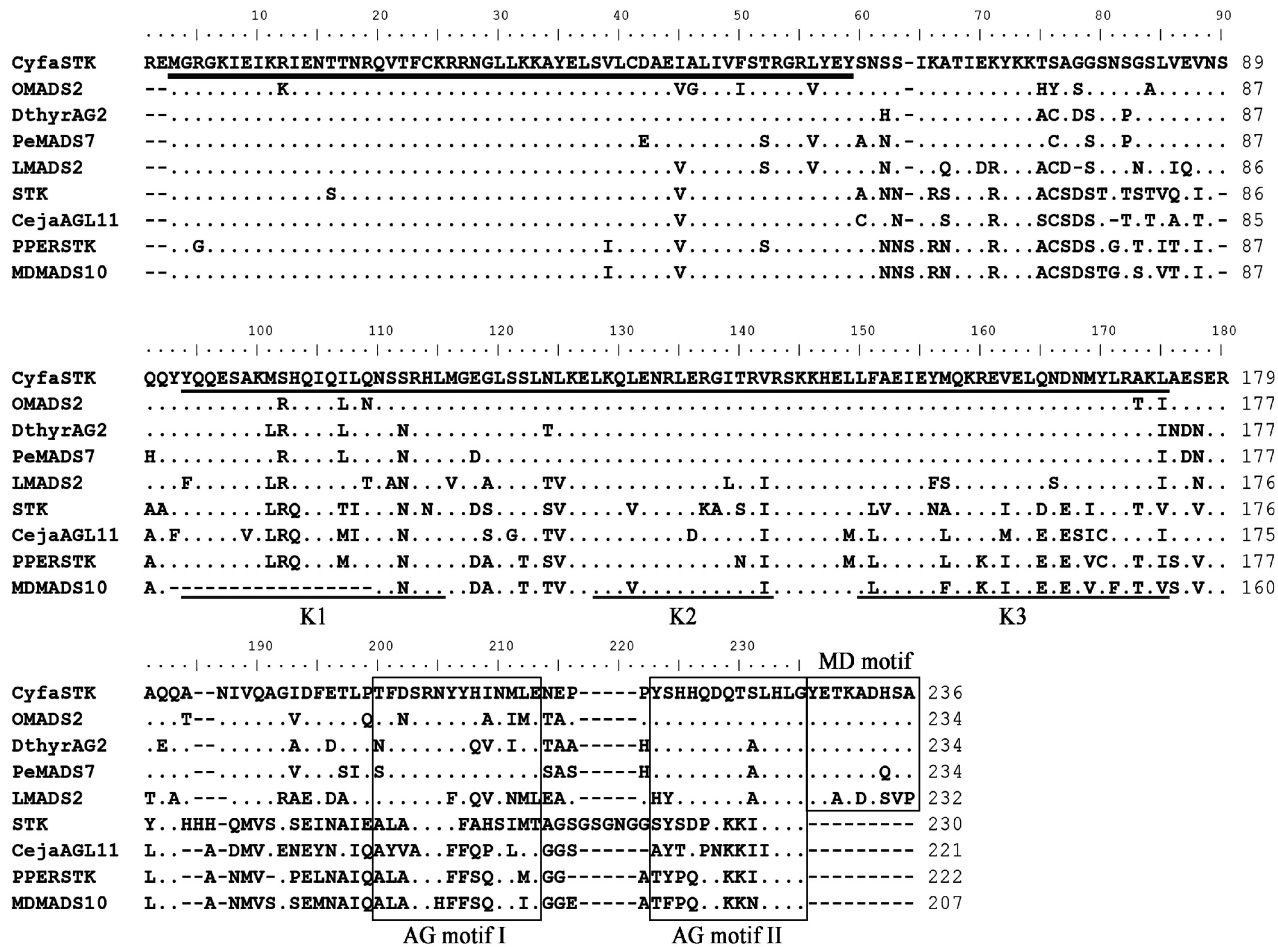


图 3 *CyfaSTK* 与其他植物 C-class 和 D-class 同源蛋白序列的分子系统进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *CyfaSTK* with other C- and D-class proteins



粗划线表示 MADS 结构域；细划线表示 K 结构域，其中包括 K1、K2 和 K3 区域；方框内分别为 AG I、AG II 和 MD 基序。
Bold underlined region represents MADS domain; Thin underlined region is K domain, which includes K1, K2, and K3 subdomains; AG motif I, AG motif II, and MD motif are boxed.

图 4 *CyfaSTK* 蛋白同源序列比对和结构分析

Fig. 4 Homologous sequence alignment and structural analysis of *CyfaSTK* protein

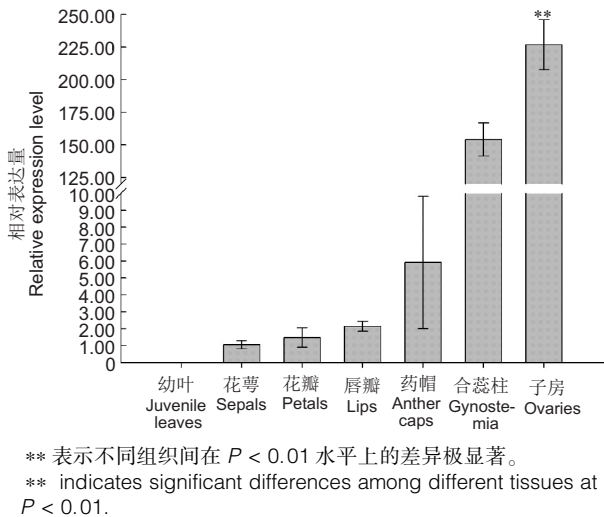


图 5 不同组织中 *CyfaSTK* 基因的表达量

Fig. 5 Expression of *CyfaSTK* in different plant tissues

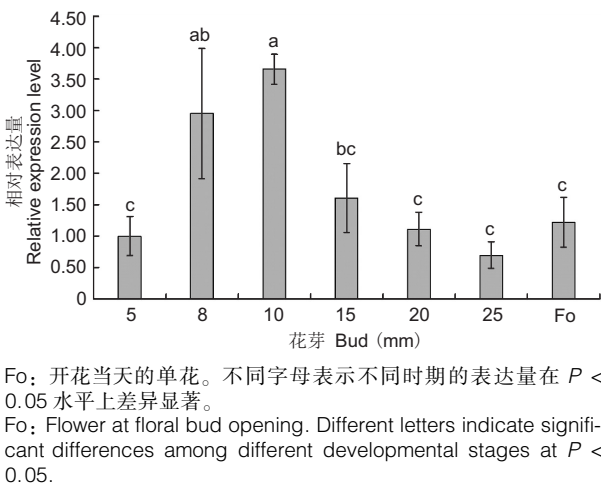


图 6 蕙兰花芽不同发育时期 *CyfaSTK* 基因的表达量

Fig. 6 Expression level of *CyfaSTK* in different developmental stages in *Cymbidium faberi*

3 讨论

为了探讨 D 类 *STK* 基因在蕙兰花器官发育中的作用,本研究从蕙兰花芽中克隆出 *CyfaSTK* 基因。通过分子系统发育分析和同源氨基酸序列比对分析,发现蕙兰 *CyfaSTK* 基因属于 D 类 MADS-box 转录因子的 *STK-like* 进化系。*CyfaSTK* 基因在蕙兰所有花器官中均有表达,其在药帽、合蕊柱和子房中的表达量相对较高,且在子房中的表达量极显著高于其他花器官。

其他兰科植物的 *STK* 同源基因,如意大利红门兰,花器官授粉后在合蕊柱和子房中的检测到 *OitaSTK* 基因表达量很高,但在唇瓣中有微弱的表达量^[11];文心兰 *OMADS2* 基因的表达只在合蕊柱和子房中检测到^[12];而小兰屿蝴蝶兰的 *PeMADS7* 仅在合蕊柱中表达^[13]。在单子叶植物水稻中,其 *STK* 同源基因 *OsMADS13* 主要在胚珠中表达,控制胚珠的正常发育^[14],而 *OsMADS21* 则仅在发育的种子中表达^[15]。研究双子叶植物 *STK-like* 基因的表达时发现,番木瓜 (*Carica papaya* L.) *CpSTK* 基因仅在雌性花和两性花中表达,在雄性花中不表达^[16]。在矮牵牛中,其 *FPB7*、*FPB11* 基因的沉默并没有导致胚珠发育明显异常,表明其胚珠发育不仅仅受 D 类基因的控制,研究还发现 *FPB7*、*FPB11* 基因也参与了花的形态建成^[17]。因此,这些研究结果表明,不同被子植物中 *STK* 同源基因的组织特异性表达存在一定差异,虽然蕙兰 *CyfaSTK* 基因在子房中的相对表达量极显著高于其他花器官,但在其他花器官中有更广泛的表达。

本研究通过分析 *CyfaSTK* 基因在蕙兰花芽分化不同时期表达量的动态变化时发现, *CyfaSTK* 基因在花芽不同分化期的表达量出现明显的波动。其在休眠后的萌动期(10 mm)表达量达到最高。在小兰屿蝴蝶兰中, *STK-like* 基因 *PeMADS7* 的表达量随花芽的分化呈先上升后下降的趋势^[13]。授粉引发的胚珠发育是兰花中一个独特的发育现象^[18]。在本研究中, *CyfaSTK* 基因在开花当天表达量开始上升,可能因为 *CyfaSTK* 基因参与了蕙兰胚珠的发育调控过程,并且需要传粉授精等因素来进一步调节。结合蕙兰 *CyfaSTK* 基因的组织特异性表达和表达量的动态变化规律,推测蕙兰 *CyfaSTK* 基因在花发育过程中主要参与调控子房的发育,但

其具体的调控花发育的机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development[J]. *Nature*, 2003, 424(6944): 85–88.
- [2] Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, et al. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2603–2611.
- [3] Song IJ, Nakamura T, Fukuda T, Yokoyama J, Ito T, et al. Spatiotemporal expression of duplicate *AGAMOUS* orthologues during floral development in *Phalaenopsis*[J]. *Dev Genes Evol*, 2006, 216(6): 301–313.
- [4] Skipper M, Johansen LB, Pedersen KB, Frederiksen S, Johansen BB. Cloning and transcription analysis of an *AGAMOUS*- and *SEEDSTICK* ortholog in the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.) [J]. *Gene*, 2006, 366(2): 266–274.
- [5] Liu ZX, Fei Y, Zhang KB, Fang ZW. Ectopic expression of a *Fagopyrum esculentum* *APETALA1* ortholog only rescues sepal development in *Arabidopsis ap1* mutant [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1–12.
- [6] Riechmann JL, Krizek BA, Meyerowitz EM. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, and *AGAMOUS* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 4793–4798.
- [7] Yang Y, Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(1): 45–59.
- [8] Kim S, Yoo MJ, Albert VA, Farris JS, Soltis PS, Soltis DE. Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: evolutionary and functional implications of a 260-million-year-old duplication[J]. *Am J Bot*, 2004, 91(12): 2102–2118.
- [9] Kramer EM, Jaramillo MA, Di Stilio VS. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the *AGAMOUS* subfamily of MADS box genes in angiosperms[J]. *Genetics*, 2004, 166(2): 1011–1023.
- [10] Yun PY, Kim SY, Ochiai T, Fukuda T, Ito T, et al. *AVAG2* is a putative D-class gene from an ornamental asparagus [J]. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17(3): 107–116.
- [11] Salemm M, Sica M, Gaudio L, Aceto S. The *OitaAG* and *OitaSTK* genes of the orchid *Orchis italica*: a comparative analysis with other C- and D-class MADS-box genes[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3523–3535.
- [12] Hsu HF, Hsieh WP, Chen MK, Chang YY, Yang CH. C/D

- class MADS box genes from two monocots, orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*), exhibit different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(6): 1029–1045.
- [13] Chen YY, Lee PF, Hsiao YY, Wu WL, Pan ZJ, *et al.* C- and D-class MADS-box genes from *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) display functions in gynostemium and ovule development [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(6): 1053–1067.
- [14] Lopez DZP, Wittich P, Enrico PM, Rigola D, Del BI, *et al.* *OsMADS13*, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development[J]. *Dev Genet*, 1999, 25(3): 237–244.
- [15] Dreni L, Jacchia S, Fornara F, Fornari M, Ouwerkerk PB, *et al.* The D-lineage MADS-box gene *OsMADS13* controls ovule identity in rice[J]. *Plant J*, 2007, 52(4): 690–699.
- [16] Yu QY, Steiger D, Kramer EM, Moore PH, Ming R. Floral MADS-box genes in trioecious papaya; characterization of *AG* and *AP1* subfamily genes revealed a sex-type-specific gene[J]. *Tropical Plant Biol*, 2008, 1(2): 97–107.
- [17] Heijmans K, Ament K, Rijpkema AS, Zethof J, Wolters-Arts M, *et al.* Redefining C and D in the petunia ABC[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2305–2317.
- [18] Tsai WC, Hsiao YY, Pan ZJ, Kuoh CS, Chen WH, Chen HH. The role of ethylene in orchid ovule development[J]. *Plant Sci*, 2008, 175(1/2): 98–105.

(责任编辑: 周媛)