

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2021.40407

李蓉, 眭梦洁, 王其刚, 余春霞, 杜光辉, 晏慧君. 月季品种‘绿萼’ *RcAG* 基因启动子克隆及分析[J]. 植物科学学报, 2021, 39(4): 407-414Li R, Sui MJ, Wang QG, Yu CX, Du GH, Yan HJ. Cloning and analysis of *RcAG* promoter in *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’[J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(4): 407-414

月季品种‘绿萼’ *RcAG* 基因启动子克隆及分析

李蓉^{1,2}, 眭梦洁², 王其刚², 余春霞², 杜光辉^{1*}, 晏慧君^{1,2*}

(1. 云南大学资源植物研究院, 昆明 650500; 2. 云南省农业科学院花卉研究所, 昆明 650205)

摘要: 月季品种‘绿萼’(*Rosa chinensis* ‘Viridiflora’)是中国古老月季最宝贵资源之一, 其花瓣、雄蕊及雌蕊均萼片化。本研究以花器官正常发育的月季品种‘月月粉’(*R. chinensis* ‘Old Blush’)为对照, 利用实时荧光定量 PCR 技术对 *RcAG* 基因在‘绿萼’花器官中的表达情况进行分析, 阐明 *RcAG* 基因在‘绿萼’花器官发育中的作用。结果显示, *RcAG* 基因在‘绿萼’中的表达明显下调。进一步克隆‘绿萼’和‘月月粉’的 *RcAG* 基因启动子, 序列分析结果表明两个启动子均含有 TATA、TATC-box 和 MBS 等顺式作用元件, 但在‘绿萼’*RcAG* 基因启动子中发现了光响应元件 MRE 和昼夜节律调控元件 Circadian, 而光响应元件 TCT-motif 只在‘月月粉’*RcAG* 基因启动子中被发现。同时, 本研究采用重亚硫酸盐测序技术分析‘绿萼’和‘月月粉’*RcAG* 基因启动子甲基化的情况, 发现‘绿萼’*RcAG* 基因启动子区域中有 4 个 CpG 位点均发生甲基化, 其甲基化程度远高于‘月月粉’。研究结果表明 *RcAG* 基因在‘绿萼’花器官中的下调表达可能与其启动子的顺式作用元件及甲基化修饰相关。

关键词: 月季品种‘绿萼’; 花器官发育; 荧光定量 PCR; 启动子克隆; 甲基化分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)04-0407-08

Cloning and analysis of *RcAG* promoter in *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’

Li Rong^{1,2}, Sui Meng-Jie², Wang Qi-Gang², Yu Chun-Xia², Du Guang-Hui^{1*}, Yan Hui-Jun^{2*}

(1. Institute of Resource Plants, Yunnan University, Kunming 650500, China;

2. Flower Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ is a valued Chinese garden rose cultivar and represents an important rose germplasm resource, in which the petals, stamens, and pistils are converted into sepal-like organs (i. e., sepalody). Expression of the *RcAG* gene in flower tissues of the *R. chinensis* ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’ varieties was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Results showed that the expression level of *RcAG* was down-regulated in *R. chinensis* ‘Viridiflora’. To explore the reason for its down-regulation, the promoter sequences of *RcAG* were cloned in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’, respectively. Results showed that the two promoter sequences contained TATA-box, TATC-box, and MBS cis-elements. Notably, MRE and Circadian were specifically found in the *RcAG* promoter in ‘Viridiflora’, while the TCT motif was only found in ‘Old Blush’. Furthermore, double sulfite sequencing technology was used to analyze promoter methylation. Results showed that all four CpG sites in the promoter region of ‘Viridiflora’ were methylated, and the

收稿日期: 2020-12-11, 修回日期: 2021-04-23。

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060693, 31660579)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (32060693, 31660579).

作者简介: 李蓉(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为月季花发育(E-mail: 443618756@qq.com)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: dgh2012@ynu.edu.cn; hjyan8203@126.com)。

degree of methylation was much higher than that of ‘Old Blush’. Our findings suggest that the down-regulation of the *RcAG* gene in ‘Viridiflora’ may be related to its promoter cis-elements and methylation.

Key words: *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’; Flower organ development; Real-time quantitative PCR; Promoter cloning; Methylation analysis

月季 (*Rosa chinensis*) 被称为“花中皇后”，是中国十大传统名花，也是世界上重要的观赏植物^[1]。同时，因其具有美丽的花型、艳丽的花色及宜人的花香而位居世界四大鲜切花之首。现代月季类型多样，品种众多。其中，花色、花型奇特的月季品种更为人们喜爱^[2, 3]。‘绿萼’ (*R. chinensis* ‘Viridiflora’) 是中国古老月季宝贵的资源之一，其花朵形态十分奇特，表现为花瓣、雄蕊和雌蕊均转变为萼片状，在欧美各国深受人们欢迎^[4]。

研究表明，植物的开花过程受到一系列花发育基因的调节和控制，花型的改变可以通过控制花器官发育相关基因的表达来实现^[5]。目前，解析花器官发育机理的 ABCDE 模型已被广泛接受，A (*AP1*、*AP2*)、B (*PI*、*AP3*)、C (*AG*)、D (*STK*、*SHP1*、*SHP2*)、E (*SEP 1-4*) 5 种类型的花器官特性基因由于具有共同的保守区域被命名为 MADS-box 类同源异型基因，其编码的转录因子在观赏植物，特别是显花植物的花器官分化等方面有着重要的调控作用^[6, 7]。‘绿萼’作为植物花器官发育同源异型突变体^[8]，一直受到广大研究者的重视。Chmelnitsky 等^[9]在 2003 年通过 Northern 杂交技术分别分析了花器官正常和畸形的月季花中 *MASAKO C1* 的同源基因 *RhAG* 在花发育各个阶段的表达量，发现在正常花型的月季花芽分化的各个阶段均有明显表达，而在畸形花的月季花芽分化早期均不表达，从而推测月季花器官萼片化可能由 *RhAG* 的异常表达导致。

目前，已有多种观赏植物 AG 同源基因被克隆，如百合 (*Lilium*)^[10]、蜡梅 (*Chimonanthus praecox* (L.) Link)^[11]、牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.)^[12]、山茶 (*Camellia japonica* L.)^[13]、兰科植物^[14, 15]等，尽管这些基因在序列上有差异，但功能相近^[16]。本研究前期克隆得到的 *RcAG* 基因在月季品种‘月月粉’ (‘Old Blush’) 中全长 931 bp，在‘绿萼’中全长 1086 bp，经 NCBI 序列比对，二者显示出极高的同源性；同时，与其他

蔷薇属植物中的 AG 基因也有较高的同源性，说明该基因在进化过程中可能存在一定的保守性。

启动子是重要的顺式作用元件，它与多种反式作用因子及 RNA 聚合酶的相互作用是启动子调控基因转录的实质^[17, 18]，在植物基因表达调控中发挥重要作用。DNA 甲基化是表观遗传修饰主要的机制之一，植物 DNA 甲基化模式的改变通常对其生长发育造成影响，甲基化程度过高或不足都有可能导致植物形态异常^[19]。启动子甲基化通过影响转录因子和顺式作用元件的结合，从而抑制转录的发生^[20]。

本研究分析了 *RcAG* 基因在两个月季品种‘绿萼’及‘月月粉’幼蕾期的表达；同时克隆‘月月粉’和‘绿萼’*RcAG* 基因启动子序列，通过分析顺式作用元件及启动子的甲基化情况进一步明确 *RcAG* 基因的功能，进而揭示 *RcAG* 基因在‘绿萼’花器官发育中的作用及其花器官萼片化的发育机制，以为深入研究植物花器官萼片化发育的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国古老月季‘绿萼’及‘月月粉’种植于云南省农业科学院花卉研究所雨树村基地。于幼蕾期取嫩叶、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊，经液氮快速冷冻后于 -80℃ 超低温冰箱保存、备用 (图 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 *RcAG* 基因在‘绿萼’及‘月月粉’花器官不同部位的表达分析

本研究基于 *RcAG* 基因的全长 cDNA 序列，设计 RT-qPCR 引物 (表 1)。利用试剂盒分别提取‘绿萼’及‘月月粉’的嫩叶、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊的总 RNA 并合成 cDNA，以 *RcGAPDH* 序列为内参，‘月月粉’和‘绿萼’各部位的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应，反应体系及程序参照睦梦洁等^[21]的方法。

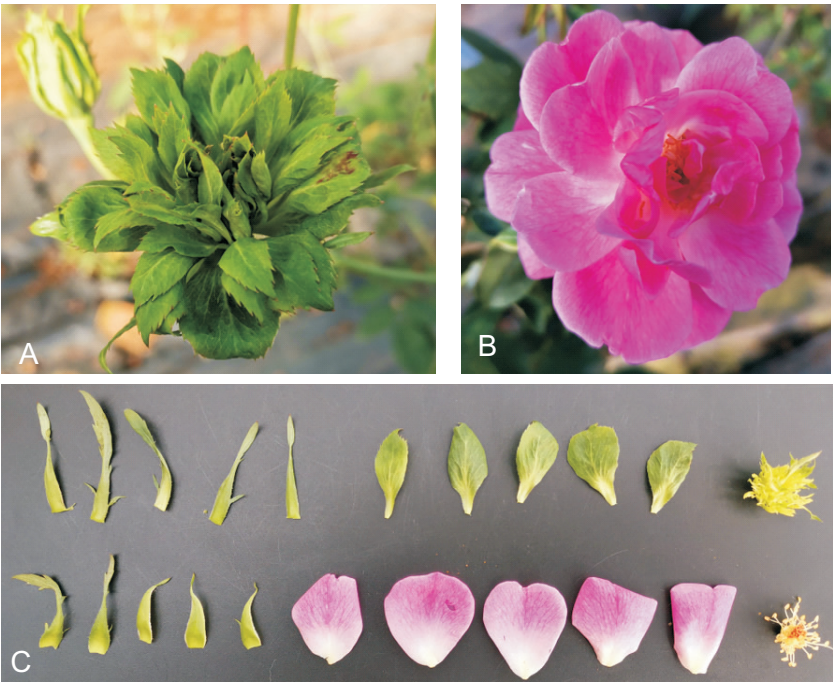


图 1 中国古老月季品种‘绿萼’ (A) 和‘月月粉’ (B) 及其花器官分解图 (C)

Fig. 1 *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ (A), *R. chinensis* ‘Old Blush’ (B), and dissected flower organs (C)

表 1 引物信息
Table 1 PCR primer information

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
RT-qPCR-F	AGTCACATTCTGCAAGCGTC
RT-qPCR-R	GCATATTCATAGAGGCGCCC
RcAG promoter-F	AGGACCGTGTGTGGGTTTGTT
RcAG promoter-R	CATTGGAGTGGTCGCTAGGC
RcAG promoter methylation-F	TAGGTTTTTGTGTTTTATTTTTGTTT
RcAG promoter methylation-R	ACCAAATTCACAACCTACCTAACCC

1. 2. 2 ‘绿萼’及‘月月粉’中 *RcAG* 基因启动子的克隆

基于 Saint-Oyant 等^[22] 发布的‘月月粉’全基因组序列(<https://iris.angers.inra.fr/obh/>), 使用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站提供的引物设计工具 Primer-BLAST 设计 *RcAG* 基因启动子引物。PCR 反应程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 20 s, 72℃延伸 90 s, 40 个循环; 72℃保持 7 min, 4℃保存。对目的片段进行胶回收, 转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中

培养。提取质粒, 阳性克隆鉴定后送测序。

1. 2. 3 *RcAG* 基因启动子的序列及甲基化分析

得到 *RcAG* 基因启动子序列后, 使用 DNA-MAN 软件进行序列拼接, 并使用 PlantCARE 软件对获得的启动子序列进行顺式作用元件分析。使用 CpG Plot/CpG Report/Isochore (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/index.html>) 和 CpG finder (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&group=programs&subgroup=promoter>) 等在线软件预测‘月月粉’和‘绿萼’ *RcAG* 基因启动子的 CpG 岛, 根据预测到的 CpG 岛设计引物 (表 1)。使用 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 在线工具设计甲基化检测引物 (表 1)。使用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒对‘绿萼’、‘月月粉’基因组 DNA 进行重亚硫酸盐转化, 之后参照试剂盒方法进行 PCR 扩增反应。对目的片段进行胶回收、转化, 阳性克隆鉴定后送测序。使用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列拼接和比对, 使用在线软件 QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp/>) 对两种月季的甲基化情况进行分析。

2 结果与分析

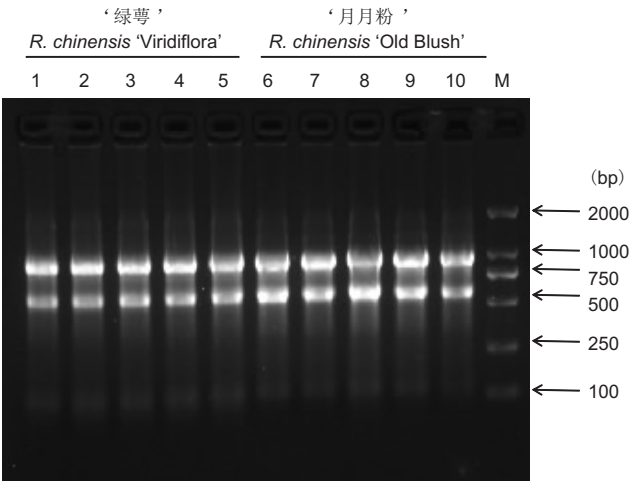
2.1 *RcAG* 基因在‘绿萼’及‘月月粉’花器官不同部位的表达分析

本研究以花器官正常发育的‘月月粉’为对照，分别提取‘绿萼’和‘月月粉’的嫩叶、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊 5 个不同部位的总 RNA。对提取的 RNA 进行电泳检测(图 2)，结果显示 28S 和 18S 条带清晰明亮，RNA 完整性较好；所有 RNA 样品 OD_{260/280} 均在 1.88~2.01，纯度较好，可以满足后续实验要求。

RT-qPCR 结果表明，*RcAG* 基因在‘绿萼’雄蕊和雌蕊中几乎不表达，而在花器官正常的‘月月粉’雄蕊和雌蕊中有较高的表达水平(图 3)。

2.2 *RcAG* 基因启动子克隆及序列分析

本研究利用设计的 *RcAG* 基因启动子克隆特异引物，克隆获得‘月月粉’和‘绿萼’中 *RcAG* 基因 ATG 上游约 1500 bp 的片段(图 4)，分别命名为 pAG-OB 和 pAG-V。*RcAG* 基因启动子顺式作用元件分析结果显示，两个启动子均含有顺式作用调节元件 A-box；光响应元件 GATA-motif、Box 4、G-box、ATC-motif；参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MBS，防御和应激元件 TC-rich；水杨酸反应元件 TCA-element；赤霉素响应元件 P-box、TATC-box；厌氧诱导元件 ARE；生长素反应元件 AuxRR-core 以及 MeJA 反应元件 CGTCA-motif。此外，发现 pAG-OB 中存在光响应元件 TCT-motif，而 pAG-V 中存在光响应元件 MRE 和昼夜节律调控元件 Circadian(表 2)。



M: DL 2000 DNA marker; 1 和 6: 嫩叶; 2 和 7: 萼片; 3 和 8: 花瓣; 4 和 9: 雄蕊; 5 和 10: 雌蕊。下同。
1, 6: Tender leaf; 2, 7: Sepal; 3, 8: Petal; 4, 9: Stamen; 5, 10: Pistil. Same below.

图 2 凝胶电泳检测结果
Fig. 2 Detection results of RNA gel electrophoresis

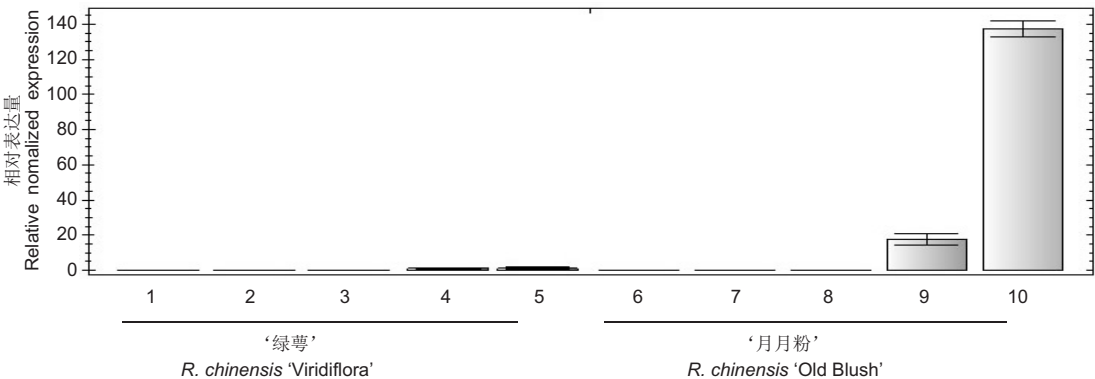


图 3 *RcAG* 基因在‘绿萼’和‘月月粉’不同组织部位中的表达
Fig. 3 Expression level of *RcAG* gene in different tissues of ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

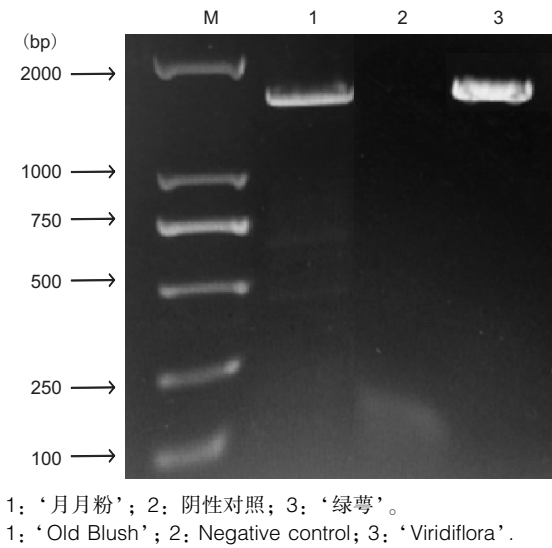


图 4 *RcAG* 基因启动子的 PCR 扩增产物
Fig. 4 Amplification products of *RcAG* promoter

2.3 *RcAG* 基因启动子甲基化分析

本研究对测序结果进行序列拼接，从引物位置截取亚硫酸氢盐处理后的 DNA 序列，发现 *RcAG* 基因启动子甲基化引物克隆得到的序列与原序列长度相同，‘绿萼’序列长度为 462 bp，‘月月粉’为 454 bp。两者的启动子甲基化程度分析结果见表 3。

CpG 位点甲基化情况分析结果表明，‘绿萼’启动子区域甲基化程度极高，有 4 个甲基化 CpG 位点分别在序列的 26、60、123、251 位，占全部 CpG 位点的 80%；而‘月月粉’序列中有 9 个 CpG 位点位于序列的 26、50、54、117、169、212、240、245、367 位，启动子甲基化程度却偏低，只有位于第 1、第 4、第 6 的 3 个 CpG 位点被甲基化，甲基化比例为 33%，远低于‘绿萼’中的比例（表 3、图 5）。

表 2 ‘绿萼’和‘月月粉’ *RcAG* 基因启动子中的顺式作用元件
Table 2 Cis-acting elements of *RcAG* promoter in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

植物材料 Material	顺式元件 Cis-element	功能 Function
‘月月粉’ ‘Old Blush’	AuxRR-core	参与生长素反应的顺式作用调控元件
	A-box	顺式作用调节元件
	Box 4	光响应元件属于保守 DNA 模块
	TATC-box	赤霉素反应的顺式作用元件
	ATC-motif	光响应元件属于保守 DNA 模块
	CGTCA-motif	参与 MeJA 反应的顺式作用元件
	G-box	光反应中的顺式作用调节元件
	GATA-motif	光响应元件的一部分
	MBS	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
	TC-rich repeats	参与防御和应激反应的顺式作用元件
‘绿萼’ ‘Viridiflora’	TCA-element	参与水杨酸反应的顺式作用元件
	P-box	赤霉素响应元件
	ARE	厌氧诱导的顺式作用调控元件
	TCT-motif	光响应元件的一部分
	MRE	参与光反应的 MYB 结合位点
	Circadian	参与昼夜节律控制的顺式作用调控元件

表 3 ‘绿萼’和‘月月粉’ *RcAG* 基因启动子亚硫酸氢盐序列信息
Table 3 Bisulfite sequence information of *RcAG* promoter in ‘Viridiflora’ and ‘Old Blush’

植物材料 Material	比对长度 Alignment length	甲基化- CpG (%) Me-CpG (%)	未转换的 (%转换) Unconverted (% converted)	甲基化模式 Methylation pattern
‘绿萼’ ‘Viridiflora’	0 (0)/462 (100.0)	4 (80.0)	0/59 (100.0)	●●●●○●
‘月月粉’ ‘Old Blush’	7 (0)/454 (98.5)	3 (33.3)	0/58 (100.0)	●○○●○○○○○

注：●表示该位点甲基化程度为 100%；○表示该位点甲基化程度为 0%。
Notes: ● indicates methylation degree of site is 100%; ○ indicates methylation degree of site is 0%.

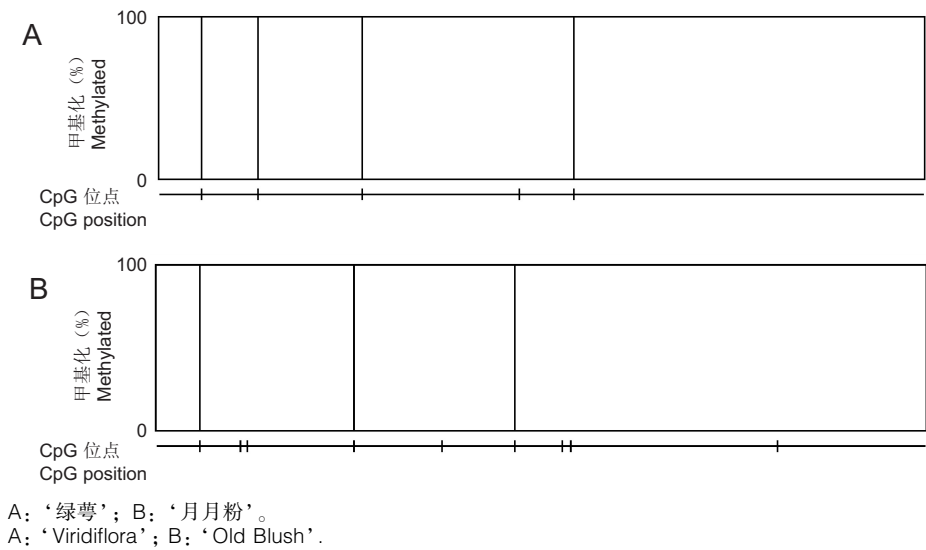


图 5 *RcAG* 基因启动子 CpG 甲基化对比
Fig. 5 Comparative analysis of CpG methylation in *RcAG* promoter

3 讨论

对于开花植物来说，花器官的发育是植物发育过程中的重要阶段。近年来，花发育模型从经典 ABC 模型^[23]逐步发展完善为 ABCDE 模型^[24]，对植物花器官发育的研究起到指导作用。中国古老月季‘绿萼’是研究花器官发育机理的宝贵材料，其花器官发育萼片化的现象一直受到广大育种工作者的关注。ABCDE 模型中 5 类基因的表达与植物花器官的形态变化密不可分，其中，C 类基因的沉默可能导致花瓣、雄蕊、雌蕊等器官转变为萼片化^[25-27]。Chmelnitsky 等^[9]发现 *RhAG* 基因在正常月季花的花芽分化的各个阶段均有明显表达，而在畸形月季花的花芽分化早期均不表达。本课题组前期的研究也确认 *RcAG* 基因的显著下调表达在‘绿萼’花器官萼片化过程中起决定性作用^[28]。本研究以花器官正常发育的‘月月粉’为对照，利用实时荧光定量 PCR 方法验证了 *RcAG* 基因在‘绿萼’花器官中的表达，与前人研究结果一致^[28]。

本研究克隆得到两个月季品种中的 *RcAG* 基因启动子，顺式作用元件分析结果表明在启动子序列中两者均存在多个典型的 TATA 和 CAAT 框；TATA 框没有方向性，可以指导起始前复合物的形成，决定转录起始位点^[29]，若其中发生碱基互换很可能导致最小启动子失活^[30]。CAAT 框是启动子中常见的顺式作用元件，对基因转录有较强

的激活作用，无方向和距离特异性，与顺式作用元件有着协同作用^[31]。此外，在两种月季的 *RcAG* 基因启动子中，均含有 GATA-motif、Box 4、G-box、ATC-motif 等多个光响应元件，还有赤霉素响应元件(P-box、TATC-box)、生长素反应元件(AuxRR-core)、MBS、ARE 和 TC-rich 元件等，说明 *RcAG* 基因的表达可能受到光照^[32]、植物生长调节剂、空气含氧量和干旱等外界刺激的影响。陈仲等^[33]研究发现光响应元件 TCT-motif 与植物开花过程密切相关，而赵玉飞^[34]研究发现 MRE 也属于光响应元件。但在本研究中，TCT-motif 只在‘月月粉’*RcAG* 基因启动子中出现，而 MRE 只在‘绿萼’中出现，昼夜节律调控元件 Circadian 也为‘绿萼’特有^[34]，说明不同的启动子顺式作用元件和昼夜节律调控可能与‘绿萼’的萼片化发育有关。

Dubois 等^[35]对 *RhAG* 等 6 个候选基因在重瓣月季和单瓣月季中的表达进行分析，发现 *RhAG* 基因在重瓣月季和单瓣月季中的表达有差异；进一步利用原位杂交技术证实了 *RhAG* 基因的差异表达，但尚不明确其原因。Jones^[36]研究发现基因的表达受到抑制可能与启动子区域甲基化相关。本研究通过重亚硫酸盐测序技术对‘绿萼’和‘月月粉’*RcAG* 基因启动子甲基化程度进行分析，结果表明‘绿萼’中 *RcAG* 基因启动子甲基化程度明显高于‘月月粉’，说明‘绿萼’中

RcAG 基因表达下调可能受到启动子甲基化的影响。

参考文献:

- [1] 张佐双, 许桂花. 花中的皇后——月季[J]. 园林, 2007, 10: 14–15.
- [2] 王海洋, 晏慧君, 张颖, 蹇洪英, 王其刚, 等. 月季(*Rosa chinensis*)丁香酚合成酶基因 *RcEGS1* 的克隆及其表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1387–1394.
Wang HP, Yan HJ, Zhang H, Jian HY, Wang QG, et al. Cloning and expression analysis of eugenol synthase gene *RcEGS1* in *Rosa chinensis* ‘Pallida’ [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(7): 1387–1394.
- [3] Yan HJ, Yang JK, Zhang H, Li SB, Zhang T, et al. Use of digital gene expression to discriminate gene expression in different developmental stages of *Rosa chinensis* ‘Pallida’ [J]. *Acta Horti*, 2015, 1064: 115–121.
- [4] Chmelnitsky I, Azizbekova N, Khayat E, Zieslin N. Morphological development of normal and phyllody expressing *Rosa hybrida* cv. Motrea flowers [J]. *Plant Growth Regul*, 2002, 37(3): 215–221.
- [5] 莫正海, 张计育, 宣继萍, 贾晓东, 郭忠仁. 植物花发育调控基因的研究与应用[J]. 北方园艺, 2013(8): 189–193.
Mo ZH, Zhang JY, Xuan JP, Jia XD, Guo ZR. Study and application on the flowering regulating genes in plants [J]. *Northern Horticulture*, 2013(8): 189–193.
- [6] Günter TE. Development of floral organ identity: stories from the MADS house [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(1): 75–85.
- [7] 孟雨婷, 黄晓晨, 侯元同, 邱念伟. 花的形态与花发育的 ABCDE 模型 [J]. 生物学杂志, 2017, 34(6): 105–107.
Meng YT, Huang XC, Hou YT, Qiu NW. The floral morphology and the ABCDE model of floral organ development [J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(6): 105–107.
- [8] Mohammed B, Annick D, Olivier R, Manuel LB. Genetics and genomics of flower initiation and development in roses [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(4): 847–857.
- [9] Chmelnitsky I, Khayat E, Zieslin N. Involvement of *RAG*, a rose homologue of *AGAMOUS*, in phyllody development of *Rosa hybrida* cv. Motrea [J]. *Plant Growth Regul*, 2003, 39(1): 63–66.
- [10] 武涵, 陈涛, 罗超, 闻永慧, 汪琼, 等. 重瓣百合‘Tiny double you’ *AGAMOUS* 同源基因的克隆及分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(14): 4545–4550.
Wu H, Chen T, Luo C, Wen YH, Wang Q, et al. Cloning and analysis of *AGAMOUS* homologous genes from double-flower lily ‘Tiny double you’ [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(14): 4545–4550.
- [11] 敬帆. 蜡梅 *CpAGL6* 基因启动子的克隆及功能的初步分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [12] 高燕, 胡永红. 牡丹花发育相关基因的克隆与分析 [C] // 中国园艺学会. 中国园艺学会观赏园艺专业委员会 2011 年学术年会. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [13] 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福, 范正琪, 周兴文. 重瓣山茶花‘金盘荔枝’C 功能基因 *CjAGL6* 的全长克隆与表达分析 [J]. 植物研究, 2013, 33(3): 330–338.
Sun YK, Li JY, Yin HF, Fan ZQ, Zhou XW. Cloning and expression analysis of C function *CjAGL6* gene cDNA from *Camellia japonica* ‘Jinpanlizhi’ [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2013, 33(3): 330–338.
- [14] 袁秀云, 许申平, 雷志华, 张燕, 崔波. 蝴蝶兰 *PhAG1b* 基因的克隆及在突变体花器官中的表达分析 [J]. 核农学报, 2018, 32(3): 438–447.
Yuan XY, Xu SP, Lei ZH, Zhang Y, Cui B. Cloning of *PhAG1b* gene from *Phalaenopsis* and its expression in floral organ mutants [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(3): 438–447.
- [15] 蒋素华, 邓祖丽颖, 郝平安, 王默霏, 袁秀云, 等. 萼脊兰 *AGAMOUS* (AG) 基因的克隆与表达分析 [J]. 河南农业大学学报, 2017, 51(6): 801–807.
Jiang SH, Deng ZLY, Hao PA, Wang MF, Yuan XY, et al. Analysis of cloning and expression analysis of *AGAMOUS* gene from *Sedirea japonica* [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2017, 51(6): 801–807.
- [16] 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.
- [17] Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ. Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(1): 89–113.
- [18] 孙晓红, 陈明杰, 潘迎捷. 启动子克隆概述 [J]. 食用菌学报, 2002, 9(3): 57–62.
Sun XH, Chen MJ, Pan YJ. A brief account of promoter cloning [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2002, 9(3): 57–62.
- [19] Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(2): 217–223.
- [20] 李法君. 启动子研究进展 [J]. 生物学教学, 2017, 42(7): 2–3.
- [21] 睦梦洁, 晏慧君, 王珍珍, 邱显钦, 蹇洪英, 等. 月季‘绿萼’花器官发育相关 microRNA 的鉴定及分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 37–46.
Sui MJ, Yan HJ, Wang ZZ, Qiu XQ, Jian HY, et al. Identification of microRNA associated with flower organ development in *Rosa chinensis* ‘Viridiflora’ [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(1): 37–46.
- [22] Saint-Oyant LH, Ruttink T, Hamama L, Kirov I, Lakhwani

- D, *et al.* A high-quality genome sequence of *Rosa chinensis* to elucidate ornamental traits[J]. *Nat Plant*, 2018, 4(7): 473–484.
- [23] Coen ES, Meyerowitz EM. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353(6339): 31–37.
- [24] Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies[J]. *Development*, 2012, 139(17): 3081–3098.
- [25] Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, *et al.* The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors[J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 35–39.
- [26] Meenu K, Shinzo T, Yoshikazu T, Tomoko M, Hiroshi T. Role of *petunia pMADS3* in determination of floral organ and meristem identity, as revealed by its loss of function [J]. *Plant J*, 2010, 32(1): 115–127.
- [27] Galimba KD, Tolkin TR, Sullivan AM, Melzer R, Theissen G, *et al.* Loss of deeply conserved C-class floral homeotic gene function and C- and E-class protein interaction in a double-flowered *ranunculid* mutant[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 2267–2275.
- [28] Yan HJ, Zhang H, Wang QG, Jian HY, Qiu XQ, *et al.* The *Rosa chinensis* cv. *Viridiflora* phyllody phenotype is associated with misexpression of flower organ identity genes[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 996.
- [29] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 陈雪梅. 植物基因启动子研究进展[J]. *遗传学报*, 2004(12): 1455–1464.
- Zhang CX, Wang WQ, Jiang XN, Chen XM. Review on plant gene promoters [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2004(12): 1455–1464.
- [30] Zhu Q, Dabi T, Lamb C. TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(10): 1681–1689.
- [31] 王颖, 麦维军, 梁承邺, 张明永. 高等植物启动子的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2003(11): 2039–2047.
- Wang Y, Mai WJ, Liang CY, Zhang MY. Advances on studies of plant promoters [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003(11): 2039–2047.
- [32] 姜妍. 光周期对大豆花序分化的影响及 *AGAMOUS* 基因的表达[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [33] 陈仲, 王佳, 安新民. 毛果杨 *PtrAP1-2* 基因启动子的克隆及其瞬时表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(6): 591–597.
- Chen Z, Wang J, An XM. Cloning and transient expression analysis of *PtrAP1-2* promoter from *Populus trichocarpa* Torr. & Gray [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(6): 591–597.
- [34] 赵玉飞. 蜡梅热激蛋白 *CpHSP1* 基因启动子的克隆与功能初探[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [35] Dubois A, Raymond O, Maene M, Baudino S, Langlade NB, *et al.* Tinkering with the C-function: a molecular frame for the selection of double flowers in cultivated roses[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9288.
- [36] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(7): 484–492.

(责任编辑: 周 媛)