

# 向日葵 MADS-box 家族基因 *HaAGL11* 的克隆及表达分析

何卓远, 韦小英, 苏周, 吴雨, 雷豆, 杨军, 邹建

(西南野生动植物资源保护教育部重点实验室 / 西华师范大学生命科学院, 四川南充 637009)

**摘要:** 花发育是被子植物生命周期史中的重要阶段, 直接关系到植物的子代繁殖和物种延续。在植物花发育进程中, MADS-box 基因发挥着关键的调控作用。本研究从向日葵转录组数据库中筛选并克隆到了一个 MADS-box 基因家族新成员 *HaAGL11* 基因, 并对其进行了系统的分析。系统发育分析结果显示, 向日葵 *HaAGL11* 基因与拟南芥中的 *AGL11* 基因具有较近的同源关系。另外, 花发育不同时期的表达模式结果显示, *HaAGL11* 基因在向日葵花器官成熟后期、小花开放期和胚胎发育早期高表达; 精细的花器官表达模式结果显示, *HaAGL11* 基因在花器官成熟后期和小花开放期的子房中特异性高表达。本研究结果表明, 向日葵 *HaAGL11* 基因在向日葵花发育后期子房和果实的发育进程中具有重要的调控作用。本研究结果为初步探究 *HaAGL11* 基因在向日葵中的花发育及果实形成的调控作用奠定基础, 有助于进一步探究向日葵生长发育的分子调控机制, 为向日葵的遗传育种提供了一定的指导线索。

**关键词:** 向日葵; 花发育; MADS-box; *HaAGL11* 基因; 基因克隆; 表达分析

## Cloning and Expression Analysis of the MADS-box Family Gene *HaAGL11* in Sunflower

HE Zhuo-yuan, WEI Xiao-ying, SU Zhou, WU Yu, LEI Dou, YANG Jun, ZOU Jian

(Key Laboratory of Southwest Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education) / College of Life Science, China West Normal University, Nanchong Sichuan 637009)

**Abstract:** Floral development, directly related to the progeny reproduction and species continuation of plants, is an important stage in the lifespan of angiosperms. The MADS-box genes play a key role during the floral development. In this study, a new member of MADS-box family gene *HaAGL11* was identified from the sunflower transcriptome datasets. Phylogenetic analysis showed that *HaAGL11* gene was closely homologous with the *AGL11* gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Moreover, the expression pattern at different stages of flower development revealed that *HaAGL11* gene was highly expressed at the late maturation stage of floret organs, flowering stage, and early embryonic development stage. The expression analysis in floret tissues indicated that *HaAGL11* was highly expressing in the ovary of late maturation stage and flowering stage. Thus, this result suggested that *HaAGL11* gene might be associated in regulating the development of ovary and fruit in the late stage of flower development and it could lay a foundation for preliminary exploration on the regulatory role of *HaAGL11* gene in flower development and fruit formation of sunflower, beneficial for further investigating the molecular regulation mechanism of growth and development of sunflower, and providing some guidance data for the genetics and breeding of sunflower.

**Key words:** sunflower; flower development; MADS-box; *HaAGL11* gene; gene clone; expression analysis

收稿日期: 2019-05-24 修回日期: 2019-08-07 网络出版日期: 2019-09-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190524003>

第一作者研究方向为向日葵遗传发育, E-mail: 2393180325@qq.com

通信作者: 邹建, 研究方向为向日葵遗传发育, E-mail: zoujian@cwnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31171587); 西华师范大学 2018 年博士科研启动专项 (18Q039); 西华师范大学英才基金 (463354)

**Foundation project:** National Natural Science Foundation of China (31171587), The Doctoral Scientific Research Foundation of China West Normal University in 2018 (18Q039), The Talent Foundation of China West Normal University (463354)

花发育是植物生长发育中的重要进程,该进程不仅关系到植物的繁衍,也与作物的产量密切相关。近年来,花发育调控机制的研究取得了一系列重要的进展。大量与花发育调控相关的基因在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)和水稻(*Oryza sativa* L.)等模式植物中相继被克隆和鉴定;并构建了花器官发育的 ABC 模型和更为完善的 ABCDE 模型<sup>[1-2]</sup>。该模型认为,植物花器官从外向内由萼片、花瓣、雄蕊和心皮四轮结构组成。A 类基因单独调控萼片,A 类基因和 B 类基因共同调控花瓣,B 类基因和 C 类基因共同调控雄蕊,C 类基因单独调控心皮;D 类基因调控胚珠;E 类基因参与了花瓣、雄蕊、心皮以及子房的形成。现有的研究报道显示,花发育 ABC 模型中,除 *AP2* 外的花同源异型基因均属于 MADS-box 基因家族成员<sup>[3]</sup>。MADS-box 基因是一类广泛存在于植物中序列特异的同源异型基因,其编码的蛋白质主要包含 MADS-box 域、K-box 域、I-box 域、保守的 C 端以及非保守的 N 端等结构域<sup>[4-5]</sup>,是一类数目庞大的转录因子家族,在植物中以二聚体或多聚体的形式结合特定的 DNA 序列调控其他基因的转录<sup>[6]</sup>。

MADS-box 广泛参与植物各个阶段的生长发育调控,尤其在高等植物的花器官发育过程中发挥着至关重要的作用<sup>[7]</sup>。在拟南芥中,A 类基因 *API* 具有决定萼片形成和决定花分生组织分化的作用<sup>[8]</sup>,Mandel 等<sup>[9]</sup>发现,在拟南芥 *ap1/cal* 双突变体中花分生组织无限生长,从而形成了一种“花椰菜”样的表型。B 类基因 *AP3* 和 *PI* 不仅调控雄蕊生长,而且在决定花瓣特性中也发挥关键性的作用<sup>[10]</sup>,*AP3* 突变致使花瓣转变为萼片,同时雄蕊转变为心皮,*PI* 突变导致雄蕊转变为心皮<sup>[11]</sup>。C 类基因 *AG* 调控雄蕊和心皮的发育<sup>[12]</sup>,*AG* 突变会导致雄蕊和心皮缺失<sup>[13]</sup>。此外,MADS-box 基因还在胚珠发育及果实成熟中发挥重要的调控作用。水稻 *OsMADS13* 突变体表现为胚珠被心皮状器官替代,说明 *OsMADS13* 在胚珠发育过程中具有非常重要的意义<sup>[14]</sup>;番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中 MADS-box 基因 *RIN* 具有促进果实成熟的功能<sup>[15]</sup>,*RIN* 转录因子能够结合 Class I 类 TCP 基因的启动子,参与果实成熟过程<sup>[16]</sup>。

向日葵(*Helianthus annuus* L.)作为重要的干果类和油料类作物,具有重要的经济价值与观赏价值。目前,关于 MADS-box 家族基因的功能研究主

要集中在拟南芥、金鱼草和水稻等模式植物中,而在向日葵的报道较少,仅分离报道了 12 个 MADS-box 基因<sup>[17-18]</sup>。此外仍有大量的向日葵 MADS-box 基因未被鉴定和报道。本研究以光雾山野生油葵(GW Mountain Wild Oil Sunflower)为材料,筛选并克隆到一个向日葵 MADS-box 基因 *HaAGL11* (*Helianthus annuus* L. *Agamous-like 11*),并对该基因进行生物信息学和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。本研究结果不仅有助于明确 MADS-box 基因在向日葵的花发育进程中调控功能,为解析向日葵花发育调控机制提供重要的数据基础,进而为挖掘向日葵增产潜能提供理论依据,而且为向日葵的遗传育种提供了一定的指导线索。

## 1 材料与方法

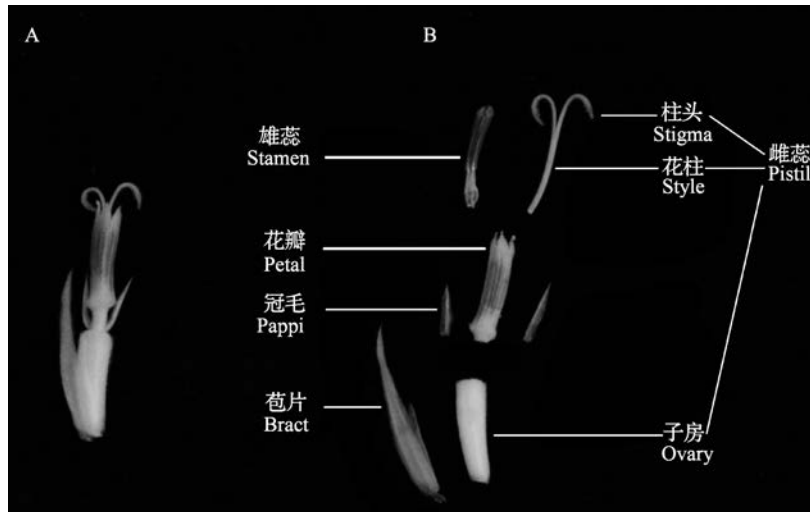
### 1.1 材料与试剂

本试验材料为光雾山野生油葵,栽种于西华师范大学生命科学学院试验田。所采集材料分别为:花发育的 7 个时期的花,分别记为 St1~St7: St1 为顶端分生组织期,St2 为花序原基期,St3 为花器官原基期,St4 为花粉分化期,St5 为花器官成熟后期,St6 为小花开放期,St7 为胚胎发育早期;其中 St6 期的小花(Flower)及其同时期的根(Root)、茎(Stem)和叶(Leaf),St7 期及之后的未成熟的果实(IMF, immature fruit); St5 与 St6 期的各种花器官(包括雄蕊、苞片、花瓣、冠毛、柱头、花柱、子房,如图 1 所示)。各材料均采于多个植株( $n>10$ ),并置于液氮中速冻,之后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

RNA 试剂盒 E.Z.N.A<sup>®</sup> Plant RNA Kit、胶回收试剂盒 D2500-01 Gel Extraction Kit (100) 等来自于 OMEGA; 荧光定量染料试剂 TB Green<sup>™</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> II、反转录试剂盒 PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 等来自于宝日医生物技术(北京)有限公司; FastPfu Fly DNA 聚合酶、克隆载体 pEASY<sup>®</sup>-Blunt Cloning Kit、大肠杆菌感受态菌种 *E.coli* Trans1-T1 来自于北京全式金生物。

### 1.2 总 RNA 的提取与反转录

分别将所采集的向日葵的根、茎、叶、花(St1~St7 阶段)、未成熟的果实、St5 与 St6 期各花器官的材料在液氮中充分碾磨后,取 0.1 g 粉末于 2 mL EP 管中,并使用 E.Z.N.A<sup>®</sup> Plant RNA Kit 试剂盒,根据说明书提取总 RNA。使用 Takara 反转录试剂盒以上述材料总 RNA 为模板进行反转录合成 cDNA。



A: 完整的向日葵小花; B: 向日葵小花解剖后的各部位图

A: the complete small flower, B: the part after the anatomy of the small flower

图 1 向日葵的小花解剖图

Fig. 1 The small flower of sunflower

### 1.3 引物的合成及 cDNA 序列扩增和克隆

根据本实验室向日葵全发育时期 454 表达谱库和向日葵花发育时期转录组数据库 (均未上传 NCBI), 筛选到 MADS-box 基因家族候选基因 *Ha9\_00013244*, BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 比对发现 *Ha9\_00013244* 与预测的向日葵 *AGL11* (GenBank 登录号为 XM\_022127755.1)

序列一致, 因而本研究将 *Ha9\_00013244* 命名为 *HaAGL11* 基因。利用软件 Primer 5.0 根据基因序列设计 PCR 扩增特异性引物 HaAGL11-F/R, qRT-PCR 引物 qHaAGL11-F/R, 以向日葵 *ef-1 $\alpha$*  基因 (*Elongation Factor 1 Alpha*, GenBank 登录号为 AY094064.1) 作为内参基因<sup>[19]</sup>, 设计内参引物 *ef-1 $\alpha$* -F/R (表 1)。

表 1 *HaAGL11* 基因 ORF 克隆引物、qRT-PCR 表达模式分析引物

Table 1 Primers used for gene isolation and real-time PCR analysis of *AGL11*

引物名称 Name of primers	引物序列 (5'→3') Sequences of primers (5'→3')	用途 Use
HaAGL11-F	AGAGAGAGAAACACCATTCCATTG	<i>HaAGL11</i> 基因克隆引物
HaAGL11-R	TGGTCAAAGATTAACCCAGCCT	
qHaAGL11-F	TCGGCCTCATCATCTTCTCC	<i>HaAGL11</i> 基因实时荧光定量 PCR 引物
qHaAGL11-R	AATGTCTTTGTGTGCGCTGA	
<i>ef-1<math>\alpha</math></i> -F	AGCCCAAGAGACCCTCAGACAAG	实时荧光定量 PCR 内参引物
<i>ef-1<math>\alpha</math></i> -R	CCCTGATGGTCCGAAGGTAACAAC	

以 cDNA 为模板, 按照 pEASY®-Blunt Cloning Kit 说明书进行 *HaAGL11* 基因序列扩增。PCR 扩增体积为 50  $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L cDNA 模板 3  $\mu$ L, 5  $\times$  TransStart Fastpfu Fly Buffer 10  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L HaAGL11 F/R 引物各 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 28  $\mu$ L, TransStart Fastpfu Fly DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 加入至 200  $\mu$ L PCR 管中, 用枪轻轻吹打混匀。执行 PCR 程序: 98  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 34 次循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 DL2000 DNA 为 Marker, PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳得到目的条带后, 按照 D2500-01

Gel Extraction Kit (100) 说明书进行胶回收操作, 连接 pEASY®-Blunt vector 克隆载体, 并转入 *E.coli* Trans-T1 感受态中, 在卡拉霉素浓度为 100 mg/L 的 LB 液体培养基中, 250 r/min 37  $^{\circ}$ C 恒温条件下培养过夜, 筛选出阳性转化子, 送北京擎科生物科技有限公司成都分公司测序。

### 1.4 *HaAGL11* 基因的生物信息学功能分析

利用在线分析工具 Open Reading Frame Finder (ORF Finder, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 *HaAGL11* 基因的 cDNA 序列进行分析, 获得了

*HaAGL11* 基因的开放阅读框 (ORF)。通过与向日葵基因组数据库 (<https://sunflowergenome.org>) 的比对, 得到 *HaAGL11* 基因的完整 DNA 序列, 再通过 Gene Structure Display Server (GSDS, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 预测 *HaAGL11* 基因的结构信息。随后, 利用 NCBI 的 Conserved Domain Search Service (CD search, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 找到 *HaAGL11* 基因所编码的预测蛋白——HaAGL11 蛋白 (XP\_021983447.1) 的保守结构域, 并使用 DNAMAN 6.0 比对 *HaAGL11* 基因的 ORF 框及其编码的氨基酸序列。利用在线分析网站 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对 HaAGL11 蛋白的亲/疏水性进行预测, ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 HaAGL11 蛋白的理化性质进行预测, 并利用 SWISS MODEL 在线分析网站 (<https://www.swissmodel.expasy.org>) 预测 HaAGL11 蛋白的三级结构。

### 1.5 *HaAGL11* 基因表达量的 qRT-PCR 分析

根据 *HaAGL11* 基因的 qRT-PCR 引物 qHaAGL11-F/R, 以向日葵的 *ef-1a* 作为内参基因, 向日葵各材料总 RNA 反转录所得的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增。扩增体积为 20  $\mu$ L, 荧光定量染料 TB Green II 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L qHaAGL11-F/R 各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L 模板 cDNA 1  $\mu$ L。采用 CFX96 Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 运行 qRT-PCR 程序, qRT-PCR 反应采用两步法: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 39 次循环, 60  $^{\circ}$ C 延伸 60 s。进行 qRT-PCR 反应时, 每个样品设置 3 次技术重复, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。

### 1.6 系统发育树的构建

利用 MEGA 10.0 构建拟南芥 MADS-box 基因和向日葵 MADS-box 基因的系统发育树, 以预测本研究中的 *HaAGL11* 基因与拟南芥中 MADS-box 基因的亲缘关系。拟南芥 MADS-box 基因从拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中获取, 向日葵 MADS-box 基因由向日葵全发育时期表达谱库 454 和向日葵花发育时期转录组数据库中筛选得到。使用邻接法构建系统发育树, 自助法统计数据, 并执行 1000 次重复。

## 2 结果与分析

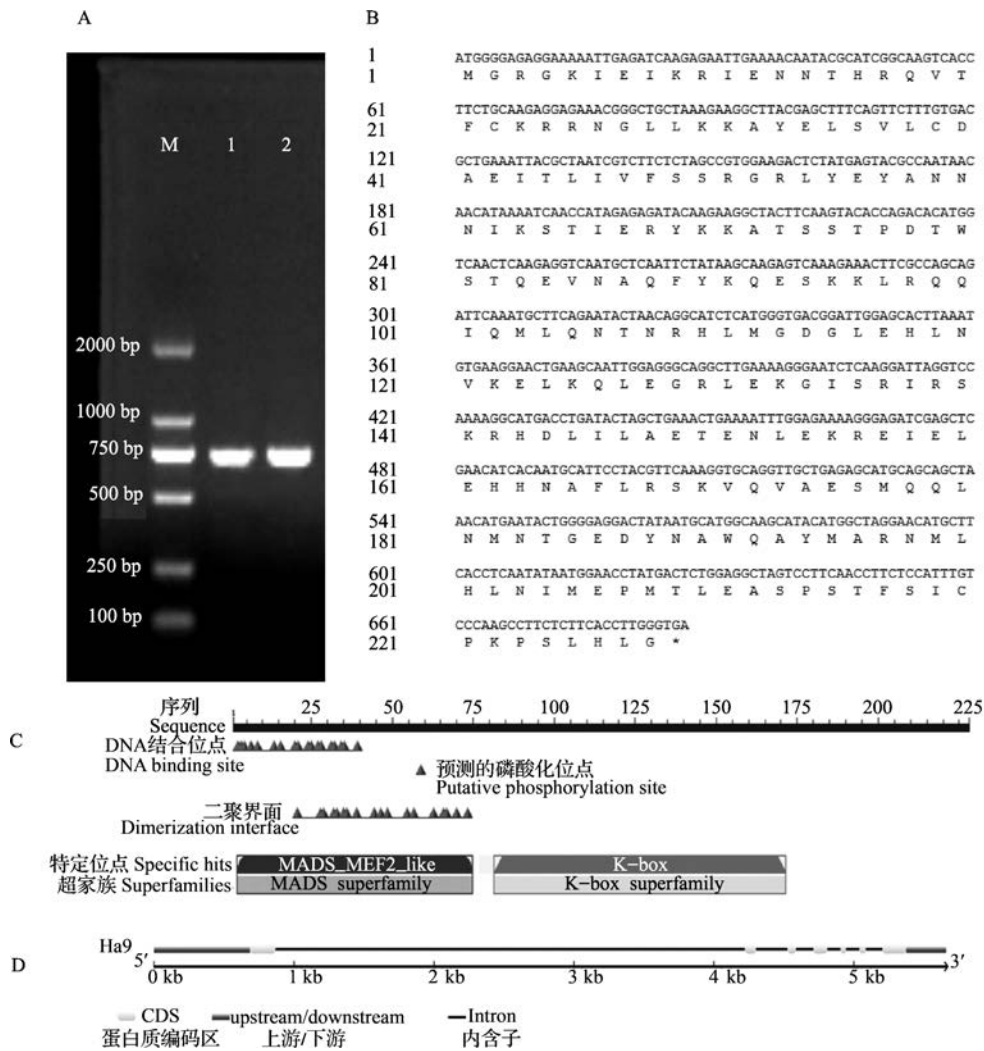
### 2.1 *HaAGL11* 基因克隆与生物信息学分析

本研究以向日葵的 cDNA 为模板, HaAGL11 F/R 为引物, 成功克隆到目标基因序列 (图 2A)。测

序结果表明, *HaAGL11* 基因扩增目标序列长度为 750 bp, 其中包含 *HaAGL11* 基因的完整 ORF。结合向日葵基因组数据库对 *HaAGL11* 基因的完整 DNA 序列进行分析, 结果表明, *HaAGL11* 基因位于向日葵的 9 号染色体上, 序列全长 5659 bp, 包括 1 个 5' 非转录区、1 个 3' 非转录区、7 个外显子和 6 个内含子 (图 2D)。ORF finder 分析显示, *HaAGL11* 基因的 ORF 为 687 bp, 共编码 228 个氨基酸 (图 2B), 该蛋白具有保守的 MADS-box 和 K-box 结构域, 分别位于其氨基酸序列的 2~75 位点和 82~172 位点 (图 2C), 表明 *HaAGL11* 基因属于 MADS-box 基因家族。理化性质分析表明, HaAGL11 蛋白属于不稳定蛋白质, 不稳定指数为 55.77。相对分子质量为 26.56 kD, 理论等电点为 9.38, 其中, 带负电荷的残基 (天冬氨酸 + 谷氨酸) 总数为 27, 占总氨基酸含量的 11.8%; 带正电荷的残基 (精氨酸 + 赖氨酸) 总数为 35, 占总氨基酸的 15.4%。脂溶性指数为 80.88, 亲水性的平均值 (GRAVY, grand average of hydropathicity) 为 -0.741, 疏水性最强的氨基酸是位于 45 位点的亮氨酸 (1.844), 亲水性最强的氨基酸是位于 95 位点的赖氨酸 (-2.633) (图 3A)。蛋白质的结构决定功能, 通过预测 HaAGL11 蛋白的三级结构发现, HaAGL11 蛋白具有 2 个  $\alpha$  螺旋, 3 个  $\beta$  片层结构, 还有一些不规则卷曲 (图 3B)。其整体形态有利于与 DNA 分子相结合, 表明 HaAGL11 蛋白是作为转录因子而发挥作用的。

### 2.2 *HaAGL11* 蛋白的同源性比对及系统发育树分析

通过 NCBI 的 BLAST 分析比对 HaAGL11 蛋白序列, 利用 DNAMAN 6.0 将预测的 HaAGL11 蛋白与其他高等植物的 MADS-box 基因家族所编码的蛋白质进行蛋白同源性比对 (图 4)。结果表明, HaAGL11 蛋白具有典型的 MADS-box 结构域, 并且与拟南芥的 AGL11 蛋白 (AAC49080.1)、猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 的 AGL 蛋白 (PSS00176.1)、矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.)、的 FBP7 (Floral Binding Protein 7) 蛋白 (CAA57311.1) 和 FBP11 蛋白 (CAA57445.1) 具有较高的同源性。利用 MEGA 10.0 构建拟南芥 MADS-box 基因与向日葵 MADS-box 基因的系统发育树 (图 5), 结果显示, *HaAGL11* 基因与拟南芥 AGL11 基因 (U20182.1) 处于同一分支上, 表明 *HaAGL11* 基因与拟南芥 AGL11 基因具有较近的同源关系。

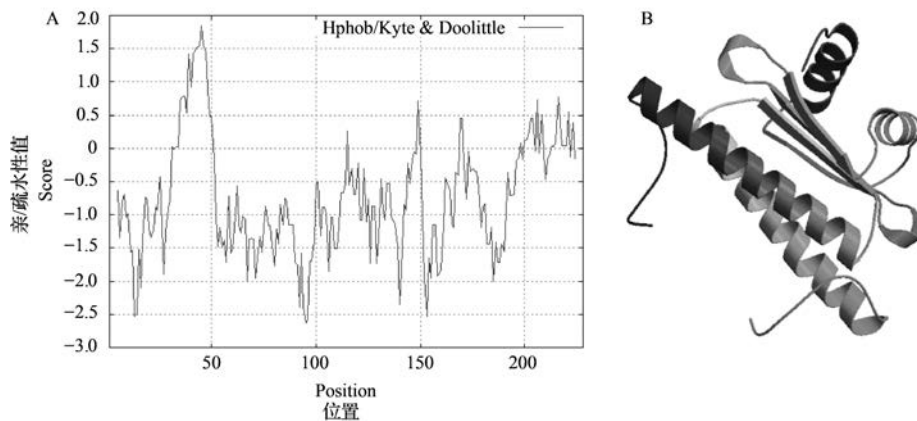


A: *HaAGL11* 基因的扩增,其中 M 为 DL 2000 DNA Maker, 1 和 2 为 *HaAGL11* 基因。B: *HaAGL11* 基因的 ORF 及其编码的氨基酸序列。  
C: *HaAGL11* 蛋白保守结构域。D: *HaAGL11* 基因结构

A: the PCR of *HaAGL11* gene, the M means the DL 2000 DNA Maker, 1 and 2 are *HaAGL11* gene. B: the ORF and encoded amino acid sequence of *HaAGL11* gene. C: the converted domain of *HaAGL11* protein. D: the structure of *HaAGL11* gene

图 2 *HaAGL11* 基因的序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of *HaAGL11* gene

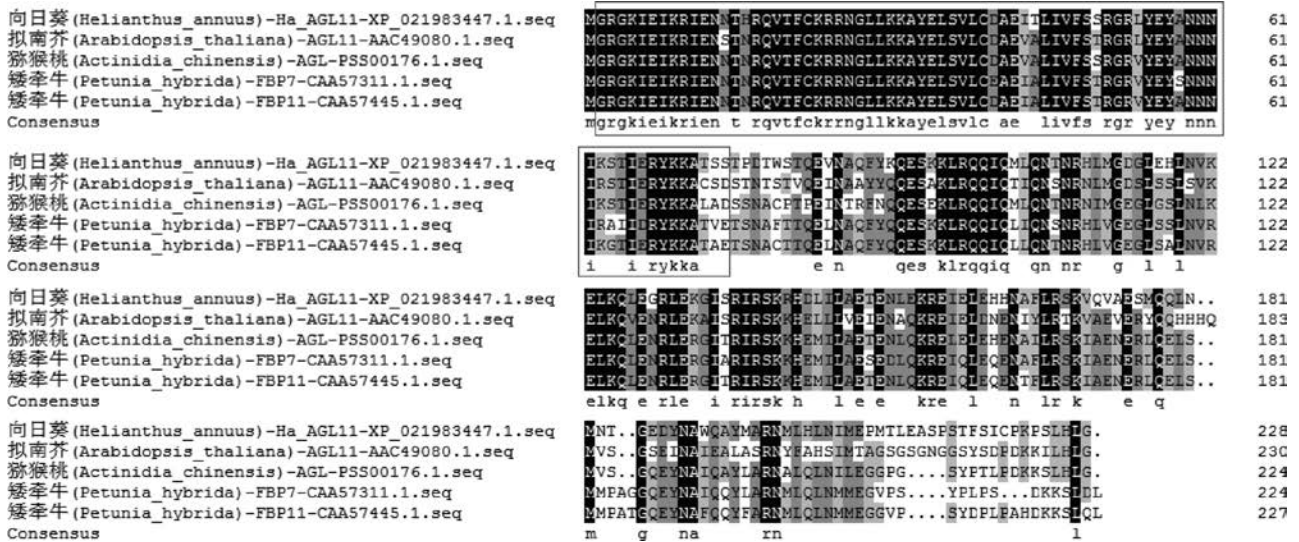


A: *HaAGL11* 蛋白亲、疏水性预测。B: *HaAGL11* 蛋白三级结构预测

A: the prediction of hydrophobicity and hydrophilicity of *HaAGL11* protein. B: the prediction tertiary structure of *HaAGL11* protein

图 3 *HaAGL11* 蛋白质分析

Fig.3 Protein analysis of *HaAGL11*



框中为 MADS-box 结构域

The content of the box is MADS-box domain

图 4 *HaAGL11* 蛋白与其他高等植物 MADS-box 蛋白的序列比对

Fig.4 Sequence alignment between *HaAGL11* protein and other higher plants MADS-box proteins

### 2.3 *HaAGL11* 基因的表达分析

为了探究 *HaAGL11* 基因在向日葵花发育进程中的作用,本研究对 *HaAGL11* 进行了精细的时空表达模式分析。组织表达模式结果显示, *HaAGL11* 基因在向日葵花和未成熟果实中特异性表达,在根、茎、叶中均不表达(图 6A)。进一步对向日葵花发育 7 个时期(St1~St7)中 *HaAGL11* 基因的表达量进行分析,结果显示, *HaAGL11* 基因在不同发育时期花中的表达量存在明显差异;其中 St1 和 St2 期不表达,在 St3 和 St4 期微量表达,在 St5 时期表达量激增,St6 期达到了峰值,St7 期保持高表达(图 6B)。这些结果说明, *HaAGL11* 可能在向日葵花发育 St5~St7 期过程中发挥作用。

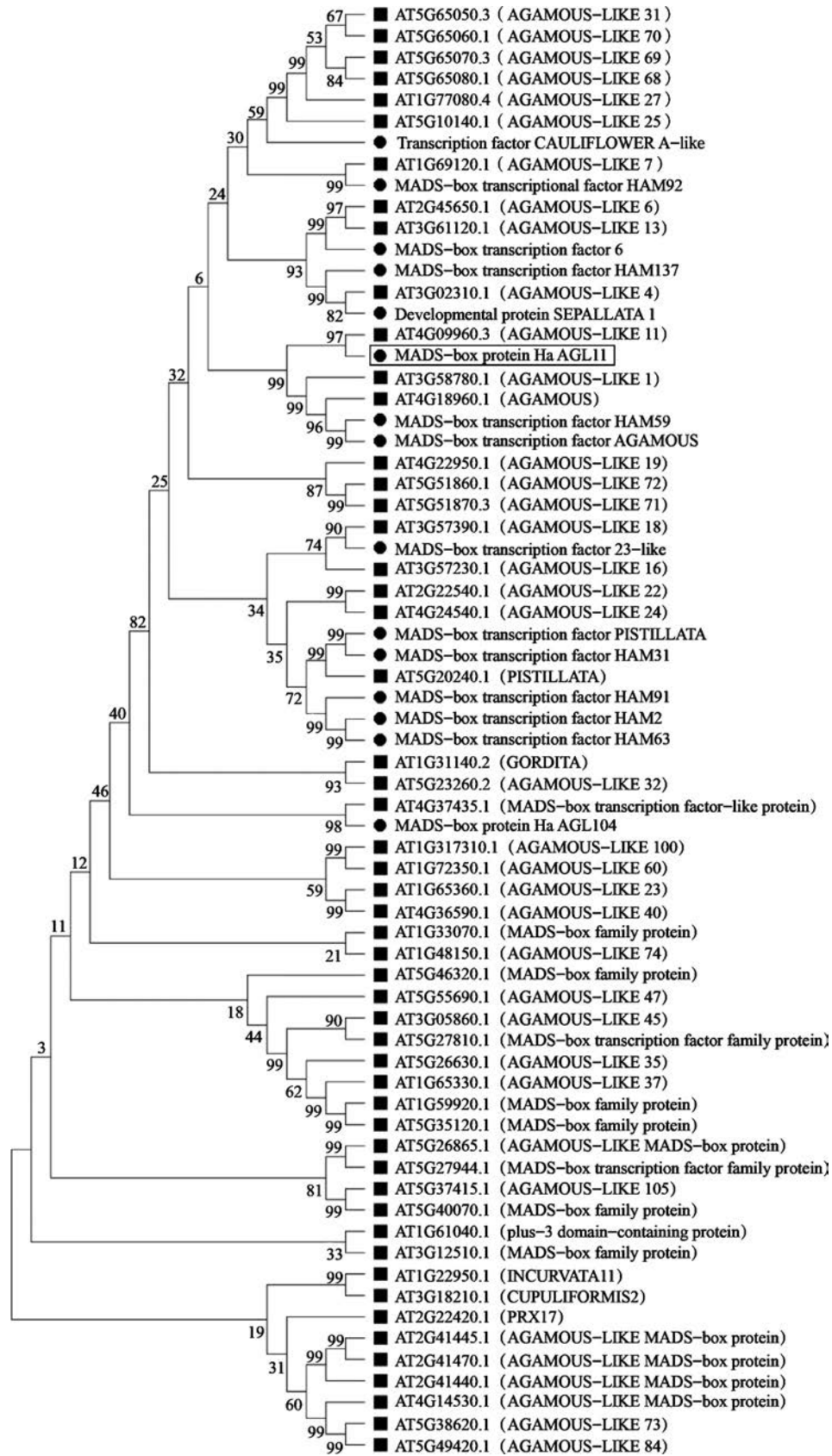
为了探究 *HaAGL11* 基因在向日葵花发育 St5 和 St6 期的具体功能部位,本研究检测了 *HaAGL11* 基因在向日葵 St5 和 St6 期各花器官中的表达水平。结果显示,在 St5 期, *HaAGL11* 基因在子房中特异性高表达,而其他花器官中微量表达或不表达(图 6C);在 St6 期, *HaAGL11* 基因也在子房中特异性高表达,并在雄蕊中低表达,在其他花器官中均未检测到其表达(图 6D)。以上结果表明, *HaAGL11* 基因在 St5 和 St6 期的小花及未成熟的果实中特异性高表达;说明在向日葵花发育过程中, *HaAGL11* 基因可能对子房和果实的发育起着重要的调控作用。

## 3 讨论

MADS-box 基因是一类广泛参与植物各阶段

生长发育的转录因子,其对花器官的发育具有重要的调控作用。本研究成功地从向日葵中克隆到一个向日葵 MADS-box 基因,该基因与 NCBI 数据库中向日葵中的预测基因 *AGL11* 为同一基因,因此将其命名为 *HaAGL11*。该基因所编码蛋白具有典型 MADS-box 和 K-box 结构域,且与拟南芥 MADS-box 基因 *AGL11* 高度同源。报道显示, *AGL11* 等 *AGLs* 类 MADS-box 基因参与植物的花发育的调控<sup>[20-21]</sup>。因此, *HaAGL11* 可能具有与拟南芥 *AGL11* 等 *AGLs* 类 MADS-box 基因类似的功能,也参与调控向日葵花发育。

本研究通过 qRT-PCR 系统分析了 *HaAGL11* 基因的时空表达模式,以探究 *HaAGL11* 基因在向日葵花发育调控中的功能。结果显示, *HaAGL11* 基因在向日葵花发育 St5 和 St6 期的小花及 St7 期的幼果中特异性高表达(图 6B)。其中, St5 期是向日葵子房等花器官的发育后期, St6 期为向日葵小花开放和受精时期,而 St7 期为向日葵受精后幼果发育时期。 *HaAGL11* 基因在这 3 个时期特异性高表达,说明 *HaAGL11* 基因可能在花器官发育、小花开放和果实的发育中起着重要的调控作用。随后进一步对 St5 和 St6 期花器官的 qRT-PCR 分析表明, *HaAGL11* 基因在 St5 和 St6 期的子房中特异性高表达,在 St6 期的雄蕊中低量表达(图 6C、D),表明 *HaAGL11* 基因在向日葵花发育期间对子房的发育发挥着关键的调控作用,并对于维持雄蕊的生物学功能可能具有一定的作用。 *HaAGL11* 的同源基因

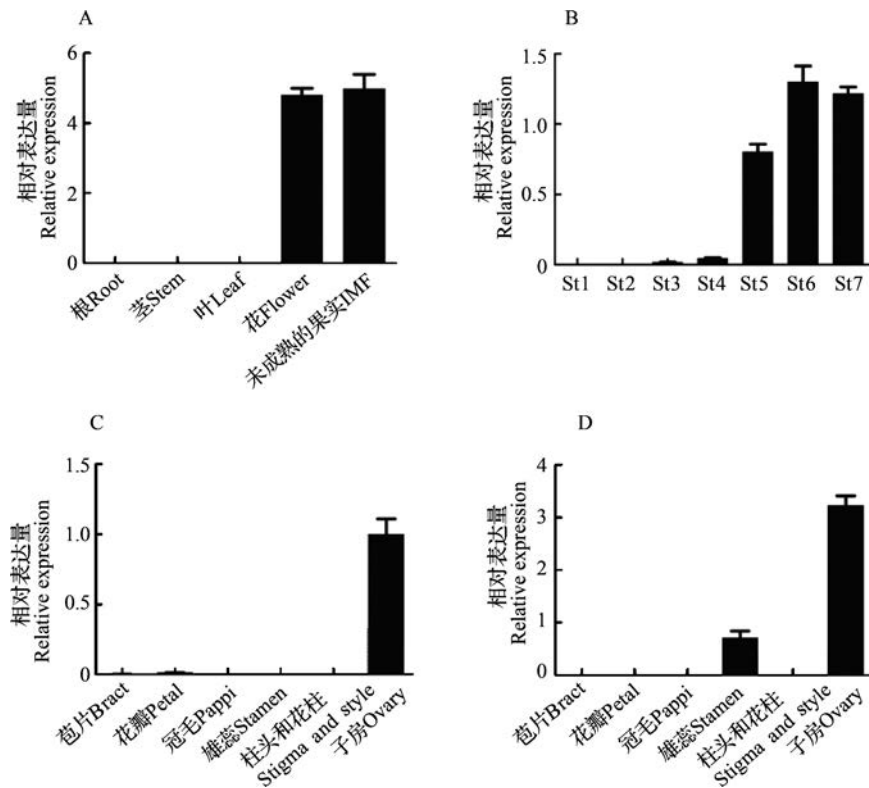


■表示拟南芥基因；●表示向日葵基因；框中为 HaAGL11 基因

■ means the genes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ● means the genes of *Helianthus annuus* L., the content of the box is HaAGL11 gene

图 5 拟南芥和向日葵 MADS-box 基因的系统发育树

Fig.5 The phylogenetic tree of MADS-box genes in *Arabidopsis* and sunflower



A: *HaAGL11* 基因在向日葵 St6 期的根、茎、叶和花, St7 期及之后的未成熟的果实等不同组织中的表达; B: *HaAGL11* 基因在向日葵花发育 St1~St7 时期的表达; C: *HaAGL11* 基因在向日葵 St5 期, 各花器官中的表达; D: *HaAGL11* 基因在向日葵 St6 期, 各花器官中的表达

A: the expression of *HaAGL11* in root, stem, leaf and flower of St6 period, and immature fruit of St7 and later period in sunflowers, B: the expression of *HaAGL11* during the St1-St7 period in the flower of sunflower, C: the expression of *HaAGL11* in flower organs of St5 period, D: the expression of *HaAGL11* in flower organs of St6 period

图 6 *HaAGL11* 基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *HaAGL11* gene

*AGL11* 在拟南芥花发育的过程中起着重要的调控作用, 研究发现, 拟南芥 *AGL11* 基因对胚珠的发育发挥着重要的作用<sup>[22]</sup>, 调控种皮的形成与发育<sup>[23]</sup>, 参与双受精过程并调控受精卵和胚乳的形成<sup>[24]</sup>。结合 *HaAGL11* 基因的时空表达模式分析, 初步证明 *HaAGL11* 与拟南芥 *AGL11* 功能类似, 可能参与调控胚珠和种皮的发生与形态建成, 并参与双受精过程。值得注意的是, 本研究表明, *HaAGL11* 可能对于维持雄蕊的生物学功能具有一定的作用, 而拟南芥 *AGL11* 未见相关报道。此外, 拟南芥 *AGL11* 参与萼片和花瓣的分化<sup>[25]</sup>, 而本研究中未见 *HaAGL11* 基因在萼片和花瓣中表达。这些结果显示出的功能差异, 可能与 *HaAGL11* 和 *AGL11* 基因在进化过程中功能分化有关。最新的研究表明, 番茄 MADS-box 基因 *SLMBP15* 对番茄果实的发育有积极的调控作用<sup>[26]</sup>, 柑橘中类似 *SEP* 的 MADS-box 基因 *Ciclev10021357* 参与果实发育和成熟过程的调控<sup>[27]</sup>, 这些 MADS-box 基因的研究间接表明本研究中的 *HaAGL11* 基因与番茄

*SLMBP15* 基因和柑橘 *Ciclev10021357* 基因具有类似的功能, 在向日葵果实发育调控中发挥重要作用。

本研究初步证明 MADS-box 基因 *HaAGL11* 在向日葵生长历程中不仅参与花发育后期子房发育的调控, 还参与调控受精后果实的发育进程。本研究为解析向日葵 MADS-box 基因 *HaAGL11* 在花发育进程中的生物学功能提供了重要的前期数据, 对于挖掘向日葵的增产潜能具有重要意义, 对向日葵的遗传育种提供了一定的指导线索。

#### 参考文献

- [1] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353 ( 6339 ): 31-37
- [2] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, Wisman E, Yanofsky M F. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 2000, 405 ( 6783 ): 200-203
- [3] Theißen G, Becker A, Rosa A D, Kanno A, Kim J T, Münster T, Winter K U, Saedler H. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42 ( 1 ): 115-149
- [4] Theißen G, Kim J T, Saedler H. Classification and phylogeny



- of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43 ( 5 ): 484-516
- [ 5 ] Kaufmann K, Melzer R, Theißen G. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 2005, 347 ( 2 ): 183-198
- [ 6 ] 赵夏云, 鲜登宇, 宋明, 汤青林. MIKC型MADS-box蛋白对开花调控作用研究进展. *生物技术通报*, 2014, 30 ( 7 ): 8-15  
Zhao X Y, Xian D Y, Song M, Tang Q L. Research progress of MIKC-type MADS-box protein regulation on flowering. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 30 ( 7 ): 8-15
- [ 7 ] 李元元, 王鲁, 苏振刚, 王元英. MADS-box基因控制植物成花的分子机理. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29 ( 6 ): 1122-1132  
Li Y Y, Wang L, Su Z G, Wang Y Y. The molecular mechanism of MADS-box genes regulates floral formation and flowering in plant. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29 ( 6 ): 1122-1132
- [ 8 ] Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz E M, Smyth D R. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*, 1991, 119 ( 3 ): 721-743
- [ 9 ] Mandel M A, Yanofsky M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 1995, 377 ( 6549 ): 522-524
- [ 10 ] Krizek B A, Meyerowitz E M. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 1996, 122 ( 1 ): 11-22
- [ 11 ] Okamoto H, Yano A, Shiraishi H, Okada K, Shimura Y. Genetic complementation of a floral homeotic mutation, *apetala3*, with an *Arabidopsis thaliana*, gene homologous to *DEFICIENS*, of *Antirrhinum majus*. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26 ( 1 ): 465-472
- [ 12 ] Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A, Meyerowitz E M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346 ( 6279 ): 35-39
- [ 13 ] Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 1989, 1 ( 1 ): 37-52
- [ 14 ] Dreni L, Jacchia S, Fornara F, Fornari M, Ouwerkerk P B, An G, Colombo L, Kater M M. The D-lineage MADS-box gene *OsMADS13* controls ovule identity in rice. *The Plant Journal*, 2007, 52 ( 4 ): 690-699
- [ 15 ] Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-Inhibitor* (*Rin*) Locus. *Science*, 2002, 296 ( 5566 ): 343-346
- [ 16 ] 冯志娟, 徐盛春, 刘娜, 张古文, 胡齐赞, 龚亚明. 植物TCP转录因子的作用机理及其应用研究进展. *植物遗传资源学报*, 2018, 19 ( 1 ): 112-121  
Feng Z G, Xu S C, Liu N, Zhang G W, Hu Q Z, Gong Y M. Molecular mechanisms and applications of TCP transcription factors in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19 ( 1 ): 112-121
- [ 17 ] Shulga O A, Shchennikova A V, Angenent G C, Skryabin K G. MADS-box genes controlling inflorescence morphogenesis in sunflower. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2008, 39 ( 1 ): 2-5
- [ 18 ] Dezar C A, Tioni M F, Gonzalez D H, Chan R L. Identification of three MADS-box genes expressed in sunflower capitulum. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54 ( 387 ): 1637-1639
- [ 19 ] Letousey P, De Zélicourt A, Vieira Dos Santos C, Thoiron S, Monteau F, Simier P, Thalouarn P, Delavault P. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology*, 2010, 56 ( 3 ): 536-546
- [ 20 ] Wei X, Wang L, Yu J, Zhang Y, Li D, Zhang X. Genome-wide identification and analysis of the MADS-box gene family in sesame. *Gene*, 2015, 569 ( 1 ): 66-76
- [ 21 ] Sun L M, Zhang J Z, Hu C G. Characterization and expression analysis of *PtAGL24*, a *SHORT VEGETATIVE PHASE/AGAMOUS-LIKE 24 (SVP/AGL24)*-type MADS-box gene from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 823
- [ 22 ] Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky M F, Kater M M, Colombo L. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15 ( 11 ): 2603-2611
- [ 23 ] Ezquer I, Mizzotti C, Nguema-Ona E, Gotté M, Beauzamy L, Viana V E, Dubrulle N, Costa de Oliveira A, Caporali E, Koronev A S, Boudaoud A, Driouich A, Colombo L. The developmental regulator *SEEDSTICK* controls the structure and mechanical properties of the *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell*, 2016, 28 ( 10 ): 2478-2492
- [ 24 ] Mizzotti C, Mendes M A, Caporali E, Schnittger A, Kater M M, Battaglia R, Colombo L. The MADS box genes *SEEDSTICK* and *ARABIDOPSIS B<sub>sister</sub>* play a maternal role in fertilization and seed development. *Plant Journal*, 2012, 70 ( 3 ): 409-420
- [ 25 ] Schmid M, Davison T S, Henz S R, Pape U J, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann J U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, 2005, 37 ( 5 ): 501-506
- [ 26 ] Yin W, Yu X, Chen G, Tang B, Wang Y, Liao C, Zhang Y, Hu Z. Suppression of *SIMBP15* inhibits plant vegetative growth and delays fruit ripening in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 938
- [ 27 ] Terol J, Nueda M J, Ventimilla D, Tadeo F, Talon M. Transcriptomic analysis of *Citrus clementine* mandarin fruits maturation reveals a MADS-box transcription factor that might be involved in the regulation of earliness. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 47