

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.10079

靳春梅, 周坤, 张今今. 茶树花发育 MADS-box 转录因子 CsGLO1、CsGLO2 与 CsAG 之间的互作关系研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(1): 79-86

Jin CM, Zhou K, Zhang JJ. Interactions of MADS-box transcription factors CsGLO1, CsGLO2 and CsAG in *Camellia sinensis* flower development[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(1): 79-86

茶树花发育 MADS-box 转录因子 CsGLO1、CsGLO2 与 CsAG 之间的互作关系研究

靳春梅, 周坤, 张今今*

(陕西师范大学, 西安 710062)

摘要: 利用酵母双杂交方法和双分子荧光互补技术(BiFC)研究了茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)花发育 MADS-box 的 B 类转录因子 CsGLO1、CsGLO2 与 C 类转录因子 CsAG 间的互作关系及其可能发生互作的亚细胞定位。通过构建 5 个酵母表达载体, 利用酵母单杂交实验检测了 3 个蛋白的转录激活活性, 并通过酵母双杂交实验分析了蛋白间的互作关系。结果显示, 3 个蛋白均无转录激活活性, 且两两之间可发生相互作用。进一步构建 6 个 BiFC 表达载体, 采用压力注射法瞬时浸染烟草(*Nicotiana benthamiana* L.) 叶表皮细胞, 并利用激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 结果表明茶树 B 类 CsGLO 与 C 类 CsAG 蛋白可在植物活细胞内形成同源和异源二聚体, 并具有在细胞质中发生互作的特定模式。本研究可为利用分子生物学技术抑制茶树“花果同现”现象提供理论依据。

关键词: 茶树; CsGLO; CsAG; 蛋白互作

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)01-0079-08

Interactions of MADS-box transcription factors CsGLO1, CsGLO2 and CsAG in *Camellia sinensis* flower development

Jin Chun-Mei, Zhou Kun, Zhang Jin-Jin*

(Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: In this study, the interactions between MADS-box B transcription factors GLO1 and CsGLO2, and C transcription factor CsAG in *Camellia sinensis* L. in relation to flower development as well as their possible subcellular localizations were investigated using the yeast two-hybrid method and bimolecular fluorescence complementation (BiFC). In this study, five yeast expression vectors were constructed and the transcriptional activation activities of the three proteins were tested by yeast one-hybridization. The interactions among the three proteins were further analyzed by yeast two-hybrid assay. The results showed that the three proteins had no transcriptional activation activity, but interactions did occur among them. Six BiFC expression vectors were constructed and transformed into the leaf epidermal cells of tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.) by pressure injection. The fluorescence signals were then observed by confocal laser scanning microscopy. The results showed that the three proteins could form homo- and heterodimers, and had specific patterns of interaction in the cytoplasm. This study could provide a theoretical basis for the inhibition of *C. sinensis* ‘flower and fruit

收稿日期: 2016-07-26, 退修日期: 2016-09-14。

基金项目: 陕西省自然基础科学研究计划项目(2014JM3075); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(GK201503048)。

This work was supported by grants from the Natural Basic Research Projects in Shaanxi Province (2014JM3075) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (GK201503048)。

作者简介: 靳春梅(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传(E-mail: 1210791162@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhangjinjin@snnu.edu.cn)。

present' using molecular biology techniques.

Key words: *Camellia sinensis*; CsGLO; CsAG; Protein interaction

茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) 属山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*), 是我国乃至全世界重要的叶用经济植物。茶树具有山茶属植物特有的“花果同现”特征, 即从花芽分化到种子成熟, 花果在植株上生长时间长达 15 ~ 16 个月^[1]。这种全年持续的生殖生长必然与叶片的营养生长产生竞争^[2], 因此, 对决定茶树花性别分化、花器官发育的 B 类和 C 类 MADS-box 基因进行分子机理研究, 可为从生殖器官分化的源头抑制茶树“花果同现”现象提供理论基础。

研究发现, 模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 花发育的 B 类和 C 类基因功能较为保守, 其中 B 类基因 *GLO* (*GLOBOSA*)/*PI* (*PISTILLATA*)-like 是决定花瓣和雄蕊分化的特征基因^[3-7]。拟南芥 B 类基因的缺失可导致花瓣和雄蕊同源异型转变为萼片和心皮^[8]; 而该类基因的异位表达, 则可使萼片转化为花瓣, 心皮转化为雄蕊^[9]。拟南芥 C 类基因 *AG* (*AGAMOUS*) 可在雄蕊和心皮原基中特异表达, 以调节雄蕊、心皮和胚珠的正常发育^[3,4,9,10], 而 *agamous* 突变体则表现出花分生组织终止延迟、雄蕊转变为花瓣、重瓣花形成以及心皮转变为萼片等性状^[7,10]。

随着花发育遗传学研究的深入, 已发现拟南芥 E 类基因 *SEP* (*SEPALLATA*) 是花器官发育的关键因子^[11-13]。E 类蛋白与 ABC 类转录因子形成四聚体复合物, 共同调控和诱导花器官的形成, 并建立了“四聚体模型”, 即 ABC 和 E 类蛋白形成 2 个同源或异源二聚体, 再特异结合到靶基因启动子区的 2 个 CarG (5'-CCA/TGG-3') 元件上, 2 个二聚体的 C 末端结合形成四聚体, 进而调控靶基因的表达, 控制花器官形成。因此, 研究茶树 B 类和 C 类蛋白二聚体的组合形式, 定位其在细胞中的互作位置, 对揭示茶树花器官的形成和性别分化具有重要意义。

双分子荧光互补技术 BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) 是一项在最接近活细胞生理条件下观察目标蛋白互作的技术, 该技术可直观地在植物活体细胞内分析蛋白间的互作关系并定位互作位点^[14]。因此, 本研究在前期克隆获得茶树花发育 B 类基因 *CsGLO1* (序列号: KJ630568)、

CsGLO2 (序列号: KJ630569) 和 C 类基因 *CsAG* (序列号: KJ630566) 的基础上^[15,16], 利用酵母双杂交方法和 BiFC 技术揭示 *CsGLO1*、*CsGLO2* 和 *CsAG* 蛋白在植物活细胞中的互作模式, 并推测其在茶树花器官分化中可能的作用机制, 以期为深入研究茶树雌雄蕊分化及果实发育的分子调控机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的 BiFC 载体 pSPYNE 和 pSPYCE 由西北农林科技大学杨亚州老师惠赠; 植物材料本氏烟草、酵母杂交载体 (pGBKT7-53、pGADT7-T、pGBKT7-lam、pGBKT7 和 pGADT7) 以及菌株 (酵母菌 AH109 和农杆菌 GV3101) 均为本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母双杂交载体构建

(1) 诱饵载体的构建

根据茶树 *CsGLO1*、*CsGLO2* 和 *CsAG* 基因的 ORF 序列设计引物 (表 1), 在 5' 端引入酶切位点 *Nco* I 和 *Bam* H I, 并在上游引物的酶切位点后添加保护碱基 AG, 下游引物酶切位点后不添加终止密码子。以连接 *CsGLO1*、*CsGLO2* 和 *CsAG* 基因的 pGEM-T 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。扩增产物经电泳检测后, 回收目的片段, 连接至 pMD-19T 载体。亚克隆经测序验证后提取重组质粒, 然后采用内切酶 *Nco* I 和 *Bam* H I 对重组质粒和载体 pGBKT7 进行双酶切, 回收目的片段, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 次日提取质粒, 再次采用 *Nco* I 和 *Bam* H I 进行双酶切检测, 同时送测序, 若测序结果比对成功, 即酵母双杂交诱饵载体构建完成。

(2) 捕获载体的构建

在引物 5' 端直接引入酶切位点 *Eco* R I 和 *Bam* H I, 上游引物无需添加保护碱基, 下游引物酶切位点后添加终止密码子 TAG (表 1)。采用内切酶 *Eco* R I 和 *Bam* H I 酶切重组质粒。其它实验

步骤同 1.2.1(1)，完成捕获载体的构建。

1.2.2 转录激活活性及蛋白间相互作用分析

采用酵母单杂交技术分析各蛋白的转录激活活性^[17]。采用酵母双杂交技术分析蛋白间的相互作用。

1.2.3 BiFC 表达载体构建

根据茶树 *CsGLO1*、*CsGLO2* 和 *CsAG* 基因的 ORF 序列设计引物，在 5'端引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Kpn* I。根据 BiFC 载体结构^[14]，pSPYNE 载体中的 eYFP_{n173} 序列位于多克隆位点 (MCS) 上游，故无需去除终止密码子；而 pSPYCE 载体中的 eYFP_{c155} 序列位于 MCS 下游，故去除插入片段 3'端的终止密码子(表 1)。其它实验步骤同 1.2.1(1)。将构建正确的重组载体命名为：pSPYNE-CsGLO1、pSPYCE-CsGLO1、pSPYNE-CsGLO2、pSPYCE-CsGLO2、pSPYNE-CsAG 和 pSPYCE-CsAG。

1.2.4 BiFC 表达载体转化农杆菌 GV3101

用冻融法将 BiFC 重组质粒转化农杆菌 GV3101，挑取单菌落进行 PCR 检测，反应程序

为：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。保存阳性菌落。

1.2.5 重组质粒瞬时浸染烟草叶表皮细胞及激光共聚焦显微镜观察

重组质粒参照 Waadt 等^[18]的方法瞬时浸染烟草叶表皮细胞。利用激光共聚焦显微镜 (Leica) 观察烟草叶表皮细胞中黄色荧光信号，激发波长设为 514 nm。

2 结果与分析

2.1 酵母双杂交载体构建

诱饵载体(图 1：A)和捕获载体(图 1：B)进行双酶切后均可产生预期目的条带，进一步测序证明酵母双杂交载体构建成功。

2.2 蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 的转录激活活性分析

将诱饵载体 pGBKT7-CsGLO1、pGBKT7-

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer sequence information

引物 Primer	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')	产物长度 Product length (bp)
诱饵载体引物	pGBKT7-CsGLO1-F	<u>CCATGGAGATGGGGAGAGGAAAGATAG</u>	639
	pGBKT7-CsGLO1-R	<u>GGATCCCAATTCTCTCTTGCAAATTTGGC</u>	
	pGBKT7-CsGLO2-F	<u>CCATGGAGATGGGGAGAGGAAAGATAG</u>	750
	pGBKT7-CsGLO2-R	<u>GGATCCCAATTCTCTCATGCAAATTTGGC</u>	
	pGBKT7-CsAG-F	<u>GGATCCCAATTCTCTCATGCAAATTTGGC</u>	642
	pGBKT7-CsAG-R	<u>GGATCCCTACAAGCTGAAGGGCAGTTT</u>	
捕获载体引物	pGADT7-CsGLO1-F	<u>GAATTCATGGGGAGAGGAAAGATAGAGA</u>	642
	pGADT7-CsGLO1-R	<u>GGATCCCTAAATTCTCTCTTGCAAATTTG</u>	
	pGADT7-CsGLO2-F	<u>GAATTCATGGGGAGAGGAAAGATAGAGA</u>	639
	pGADT7-CsGLO2-R	<u>GGATCCCTAAATTCTCTCATGCAAATTTG</u>	
BiFC 载体引物	pSPYNE-CsGLO1-F	<u>GGATCCATGGGGAGAGGAAAGATA</u>	696
	pSPYNE-CsGLO1-R	<u>GGTACCAGCAACCAAAATTAACCCAT</u>	
	pSPYCE-CsGLO1-F	<u>GGATCCAGAGAGAAATGGGGAGAG</u>	647
	pSPYCE-CsGLO1-R	<u>GGTACCAATTCTCTCTTGCAAATTTG</u>	
	pSPYNE-CsGLO2-F	<u>GGATCCATGGGGAGAGGAAAGATA</u>	680
	pSPYNE-CsGLO2-R	<u>GGTACCAATTCTCTCATGCAAATTTG</u>	
	pSPYCE-CsGLO2-F	<u>GGATCCAGTGAGAGATGGGGAGAG</u>	644
	pSPYCE-CsGLO2-R	<u>GGTACCAATTCTCTCATGCAAATTTG</u>	
	pSPYNE-CsAG-F	<u>GGATCCATGTCGTATCTGAATCAATC</u>	784
	pSPYNE-CsAG-R	<u>GGTACCACAGTCCCTTTGAGCATA</u>	
	pSPYCE-CsAG-F	<u>GGATCCACAGTCCCTTTGAGCATA</u>	754
	pSPYCE-CsAG-R	<u>GGTACCTACAAGCTGAAGGGCAGT</u>	

注：下划线表示酶切位点。
Note: Underlined sequences are the corresponding restriction enzyme sites.

CsGLO2、pGBKT7-CsAG 和阳性对照 pGBKT7-53+pGADT7-T、阴性对照 pGBKT7 依次转化酵母菌 AH109 (图 2: C), 并分别在完全培养基 (YPDA)(图 2: A)和营养缺陷型培养基(图 2: B)上进行培养。结果显示, 各实验组在完全培养基上生长良好; 在营养缺陷型培养基上, 除阳性对照生长良好外, 阴性对照和实验组均不能存活, 实验表明蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 不具备单独的转录激活活性。

2.3 酵母双杂交检测蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 的互作

将蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 的诱饵载体和捕获载体组成如下实验组: pGBKT7-CsAG + pGADT7-CsGLO2、pGBKT7-CsAG + pGADT7-CsGLO1、pGBKT7-CsGLO2 + pGADT7-CsGLO1、pGBKT7-CsGLO1 + pGADT7-CsGLO2; 对照组为: 阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T 和阴性对照 pGBKT7-lam + pGADT7-T。将上述组合依次共转化酵母菌 AH109(图 3: C), 并分别在完全培养基(图 3: A)和营养缺陷型培养基(图 3: B)上进行培养。结果显示, 各实验组在完全培养基上生长

良好, 而在培养基缺陷型培养基上, 除阴性对照无法存活外, 阳性对照和各实验组均生长良好, 表明 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 蛋白之间在特定区域表达均可形成二聚体蛋白复合物。

2.4 BiFC 表达载体的构建

以重组质粒 pSPYNE-CsGLO1、pSPYNE-CsGLO2、pSPYNE-CsAG、pSPYCE-CsGLO1、pSPYCE-CsGLO2 和 pSPYCE-CsAG 为模板进行 PCR 扩增, 实验结果表明, 每个重组质粒的扩增产物长度与预测片段大小一致(图 4), 测序结果进一步证明目的基因已插入载体 pSPYNE 和 pSPYCE 的正确位置, 表明重组载体构建成功。

2.5 BiFC 检测茶树 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 蛋白间的互作关系

将蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 的互作方式设置为 6 个实验组, 分别是: pSPYNE-CsGLO1和 pSPYCE-CsGLO1、pSPYNE-CsGLO2 和 pSPYCE-CsGLO2、pSPYNE-CsAG 和 pSPYCE-CsAG、pSPYNE-CsGLO1 和 pSPYCE-CsAG、pSPYNE-CsGLO2 和 pSPYCE-CsAG、pSPYNE-CsGLO1 和 pSPYCE-CsGLO2。采用压力注射法瞬时浸染烟草叶表皮细胞, 并注射空载体 pSPYNE 和 pSPYCE 作为阴性对照。

研究结果发现, 瞬时转化阴性对照的烟草细胞无黄色荧光信号(图 5: D), 而实验组的烟草细胞质均能检测到均匀的黄色荧光(图 5: A ~ C), 表明茶树蛋白 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 在细胞质中可发生互作形成同源二聚体。

在异源二聚体的互作研究中, 转化阴性对照的烟草细胞未检测到黄色荧光信号(图 6: D), 而实验组在烟草细胞质中检测到明亮的黄色荧光

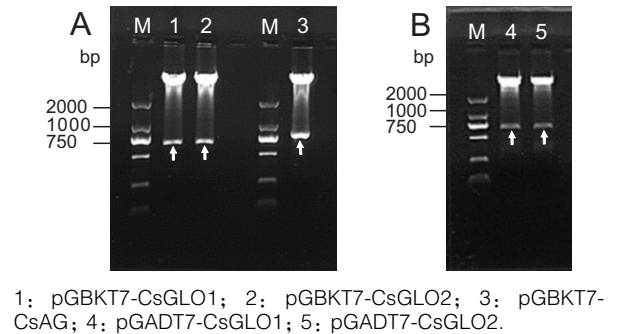
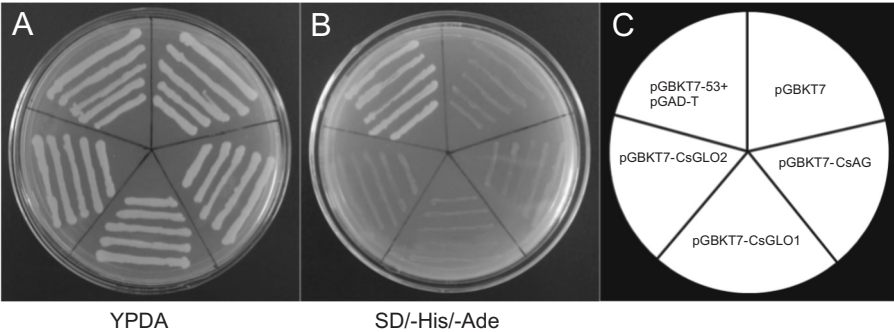


图 1 诱饵载体和捕获载体的双酶切验证
Fig. 1 Double enzyme digestion of bait and prey vectors



A: 完全培养基; B: 营养缺陷型培养基; C: 转化酵母菌示意图。
A: YPDA; B: SD/-His/-Ade; C: A sketch panel indicating the position of each strain.

图 2 转录激活活性分析
Fig. 2 Analysis of transcriptional activation activity

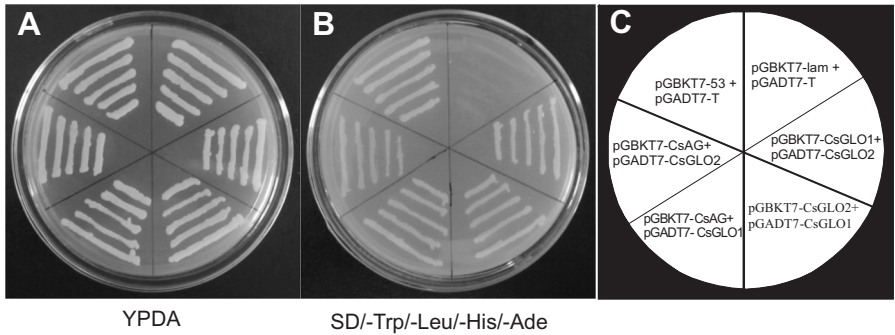


图 3 酵母双杂交实验

Fig. 3 Yeast two-hybrid assays between CsGLO1, CsGLO2 and CsAG

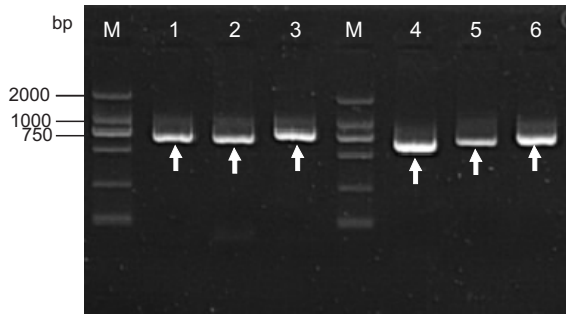


图 4 用于 BiFC 互作检测的重组质粒 PCR 验证

Fig. 4 PCR verification of the recombination plasmid used in BiFC

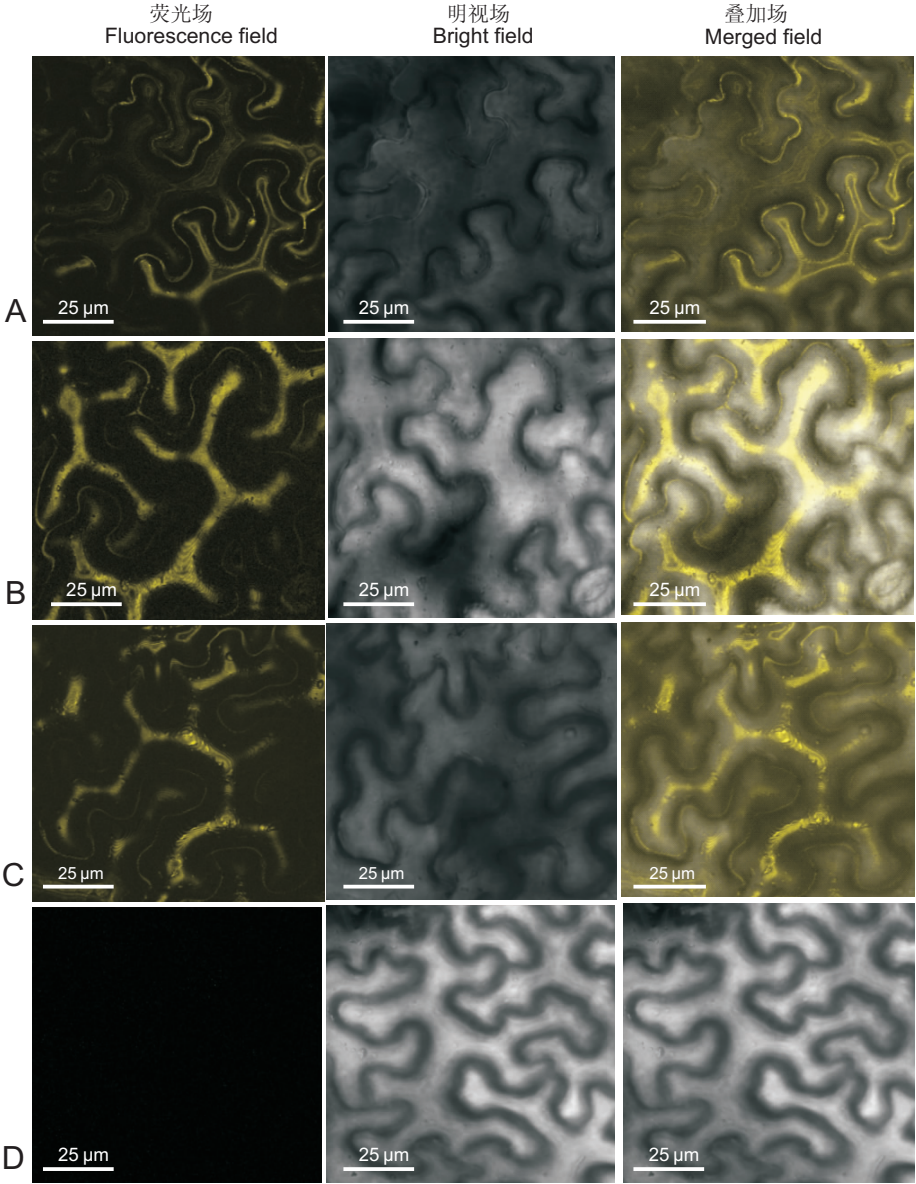
(图 6: A ~ C), 因此, 可以推断 CsGLO1-CsAG、CsGLO2-CsAG 和 CsGLO1-CsGLO2 蛋白主要在细胞质中发生互作并形成异源二聚体。

3 讨论

开花植物中不同类型的花器官, 如: 萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊都是由花器官特征基因决定的, 而这些基因产物即转录因子是以一种组合的方式形成蛋白复合物来发挥其功能, 从而决定花分生组织分化为不同的花器官。因此, 确定这类转录因子的互作模式是功能基因组学研究的重要组成部分^[19]。“四聚体模型”指出, 拟南芥中的 B 类和 C 类基因编码 MIKC 型转录因子, 可以形成 AP3-PI 和 AG-SEP 等异源二聚体蛋白复合物, 进而与其它二聚体通过 C 末端结合形成四聚体绑定在靶基因上游, 以调控靶基因的表达^[13]。

作为花器官特征决定基因, 前期亚细胞定位结果显示, 茶树 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 蛋白均为核定位蛋白^[15]。本研究发现这 3 个转录因子均不具备转录激活活性, 因此可能需要形成二聚体或四聚体蛋白复合物, 才能调控下游靶基因的转录和表达。拟南芥 PI 和 AG 蛋白也具有相似的转录激活活性, 而拟南芥 MADS 蛋白家族中有核小体重组因子及共上调和共下调因子, 它们可能与其它转录因子(如 SEP3 和 AP1)结合, 协同控制转录激活和抑制, 参与第二、第三轮花器官的生长发育^[20]。

本研究 BiFC 检测结果进一步解析了茶树花发育转录因子 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 在活细胞中的互作模式。与酵母双杂交实验结果一致, 这 3 个转录因子都具备相互结合形成蛋白二聚体复合物的能力, 且所有同源和异源二聚体均定位于细胞质中。但也有研究得出了不同的结论, 如洋酸浆 (*Physalis pubescens* L.) 中 B 类转录因子 PFGLO1 不具备单独的核定位能力, 必须与 PFDEF 和 PFAG 结合后共定位至细胞核中, 而 PFGLO2 具备单独的核定位能力, 其同源二聚体定位在细胞质中, 但未能与 PFGLO1 和 PFAG 形成可检测到的异源二聚体^[21,22]。此外, 西红柿 (*Solanum lycopersicum* L.) 的 SIGLO1、SIGLO2 和 TAG1 蛋白之间、本氏烟草的 NbGLO1 和 NbGLO2 蛋白之间以及雪山茶 (*Camellia japonica* subsp. *rusticana* L.) 的 GLO1 和 GLO2 蛋白之间也表现出不同的互作模式^[23-25]。可见, 不同植物 B 类和 C 类转录因子的核定位能力及蛋白互作方式也可能各不相同, 由此进一步说明茶树 B 类和 C 类蛋白间的互作模式具有种属特异性, 而蛋白 CsGLO1 和 CsGLO2



A: pSPYNE-CsGLO1 and pSPYCE-CsGLO1; B: pSPYNE-CsGLO2 and pSPYCE-CsGLO2; C: pSPYNE-CsAG and pSPYCE-CsAG; D: pSPYNE and pSPYCE.

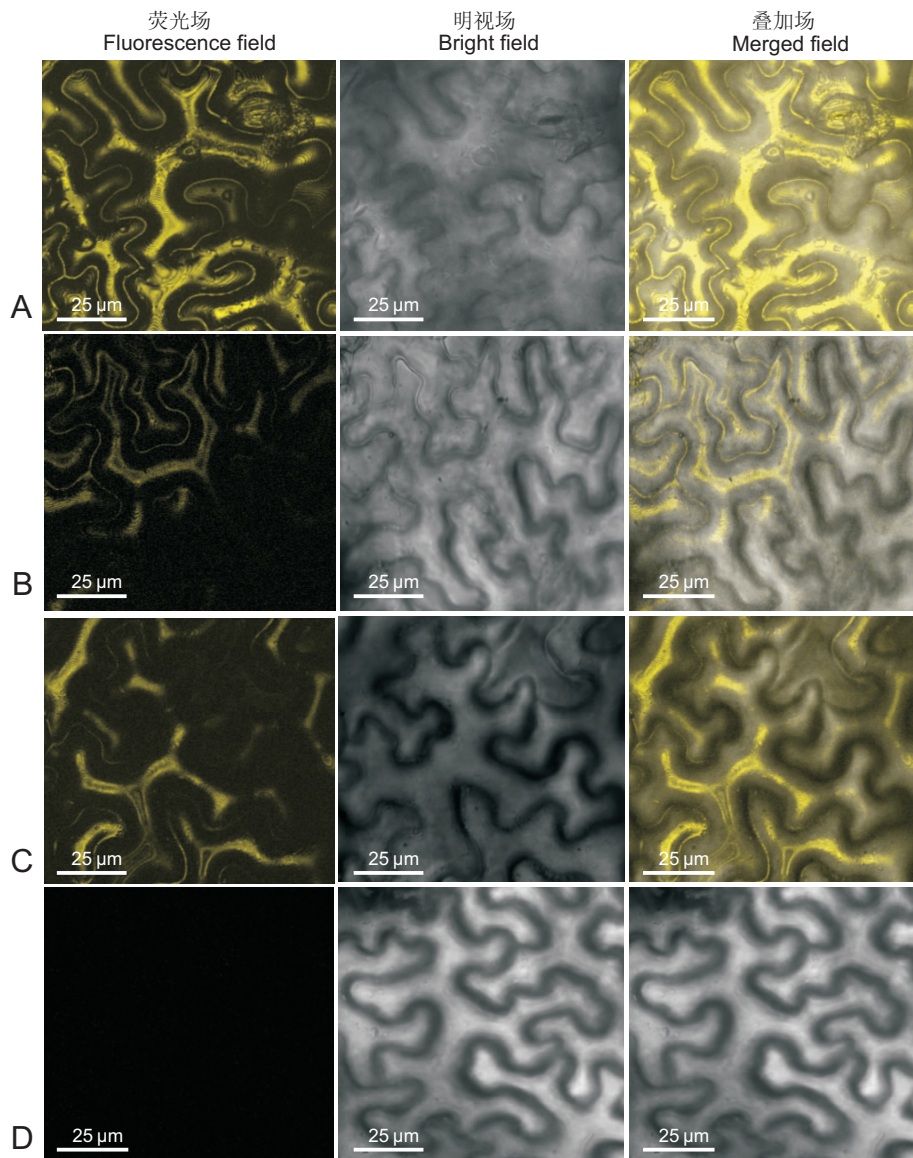
图 5 茶树 CsGLO1、CsGLO2 与 CsAG 蛋白在烟草叶表皮细胞中同源互作的 BiFC 检测

Fig. 5 Verification of homology interactions among CsGLO1, CsGLO2 and CsAG in *N. benthamiana* leaf epidermal cells

均可与 CsAG 相互作用，一定程度上表明 CsGLO1 和 CsGLO2 转录因子的功能具有相似性。

研究发现，拟南芥中单独定位于细胞质的 AP3 和 PI 转录因子，在细胞质中形成二聚体复合物后暴露出共定位信号是其进入细胞核调控靶基因表达的必要条件^[26]。在其它 non-MADS 蛋白的帮助下，同源或异源二聚体结合到靶基因启动子区，从而调控靶基因的转录^[27,28]。本研究中茶树 CsGLO1、CsGLO2 和 CsAG 转录因子均有核定位能力，且二聚体定位于细胞质，因此可以推测，这

3 个转录因子在细胞质中形成二聚体复合物，然后运输到细胞核并结合到靶基因启动子区以调控靶基因的表达，最终指导花器官形成。茶树 CsGLO1 和 CsGLO2 蛋白独特的定位能力和互作模式，反映了其在花发育中具有关键作用，如可能通过形成 CsGLO1-CsGLO2 二聚体作为一个功能单位共同调控第二轮花瓣和第三轮雄蕊的发育；而 CsGLO1-CsAG 和 CsGLO2-CsAG 二聚体的形成不仅说明花瓣和雄蕊的发育机制可能取决于 CsAG 蛋白的表达特性，还反映出 CsGLO1 和 CsGLO2 蛋



A: pSPYNE-CsGLO1 and pSPYCE-CsAG; B: pSPYNE-CsGLO2 and pSPYCE-CsAG; C: pSPYNE-CsGLO1 and pSPYCE-CsGLO2; D: pSPYNE and pSPYCE.

图 6 茶树 CsGLO1、CsGLO2 与 CsAG 蛋白在烟草叶表皮细胞中异源互作的 BiFC 检测

Fig. 6 Verification of heterology interactions among CsGLO1, CsGLO2 and CsAG in *N. benthamiana* leaf epidermal cells

白间具有相似的功能。因此，研究茶树 MADS-box 蛋白间的互作模式可为进一步阐明茶树花发育分子调控模型提供理论依据。

参考文献：

[1] 叶乃兴, 刘金英, 饶耿慧. 茶树的开花习性与茶树花产量 [J]. 福建茶业, 2008, 32(4) : 16-18.
Ye NX, Liu JY, Rao GH. Flowering habit and flower yield of tea plant[J]. *Tea In Fujian*, 2008, 32(4) : 16-18.
[2] 杨昌云, 朱永兴. 茶树生殖生长的影响因素及控制方法 [J]. 中国茶叶, 1999(5) : 6-7.
Yang CY, Zhu YX. Influencing factors and control methods

of reproductive growth of tea plant[J]. *China Tea*, 1999 (5) : 6-7.
[3] Berner M, Angenent GC. Floral organ initiation and development[J]. *Journal of the Royal Asiatic Society*, 2010, 100(1) : 29-36.
[4] Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(1) : 73-79.
[5] Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development [J]. *New Phytologist*, 2014, 201(1) : 16-30.
[6] Kramer EM, Dorit RL, Irish VF. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplica-

- tion and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages[J]. *Genetics*, 1998, 149(2): 765–783.
- [7] Wuest SE, Wellmer F. Molecular basis for the specification of floral organs by *APETALA3* and *PISTILLATA*[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(33): 13452–13457.
- [8] Sundström JF, Nakayama N, Glimelius K, Irish VF. Direct regulation of the floral homeotic *APETALA1*, gene by *APETALA3* and *PISTILLATA* in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2006, 46(4): 593–600.
- [9] Gómez-Mena C, De FS, Costa MM, Angenent GC, Sablowski R. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis [J]. *Development*, 2005, 132(3): 429–438.
- [10] Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors[J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 35–39.
- [11] Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(21): 1935–1940.
- [12] Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 525–529.
- [13] Theissen G, Saedler H. Plant biology. Floral quartets[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 469–471.
- [14] Waadt R, Schmidt LK, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes *in planta* [J]. *Plant J*, 2008, 56(3): 505–516.
- [15] 周坤. 茶树 MADS-box 家族 B 类基因 *CsGLO1* 和 *CsGLO2* 的克隆及其与 C 类基因 *CsAG* 的功能研究[D]. 陕西: 陕西师范大学, 2015.
- Zhou K. Cloning of *CsGLO1* and *CsGLO2* of the MADS-box family B gene and its function on *CsAG* in *Camellia sinensis*[D]. Shaanxi: Shaanxi Normal University, 2015.
- [16] 程国山. 茶树 *CSAG* 基因克隆及 *AG* 基因系统进化分析[D]. 陕西: 陕西师范大学, 2014.
- Cheng GS. Cloning of *CsAG* gene and phylogenetic analysis of *CsAG* gene in *Camellia sinensis* [D]. Shaanxi: Shaanxi Normal University, 2014.
- [17] 欧阳沫, 唐潇, 黄惜, 袁红梅. 巴西橡胶树 *HbICE1* 基因酵母菌双杂交诱饵载体的构建及互作蛋白的筛选[J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 255–262.
- OuYang M, Tang X, Huang X, Yuan HM. Construction of yeast two-hybrid bait vector and the screening of proteins interacting with *HbICE1* in *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(2): 255–262.
- [18] Waadt R, Schlücking K, Schroeder JI, Kudla J. Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the *in vivo* study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1062: 629–658.
- [19] Gramzow L, Theissen G. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants[J]. *Genome Biol*, 2010, 11(6): 1–11.
- [20] ÓMaoiléidigh DS, Wuest SE, Rae L, Raganelli A, Ryan PT, Kwasniewska K, Das P, Lohan AJ, Loftus B, Graciet E, Wellmer F. Control of reproductive floral organ identity specification in *Arabidopsis* by the C function regulator *AGAMOUS*[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(7): 2482–2503.
- [21] Zhang JS, Li Z, Zhao J, Quan H, Zhao M, He C. Deciphering the *Physalis floridana double-layered-lantern1* mutant provides insights into functional divergence of the *GLOBOSA* duplicates within the Solanaceae [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 748–764.
- [22] Zhang S, Zhang JS, Zhao J, He C. Distinct subfunctionalization and neofunctionalization of the B-class MADS-box genes in *Physalis floridana* [J]. *Planta*, 2015, 241(2): 387–402.
- [23] Leseberg CH, Eissler CL, Wang X, Johns MA, Duvall MR, Mao L. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(8): 2253–2265.
- [24] Geuten K, Irish V. Hidden variability of floral homeotic B genes in Solanaceae provides a molecular basis for the evolution of novel functions[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2562–2578.
- [25] Viaene T, Vekemans D, Irish VF, Geeraerts A, Huysmans S, Janssens S, Smets E, Geuten K. *Pistillata*-duplications as a mode for floral diversification in (Basal) Asterids[J]. *Mol Biol Evol*, 2009, 26(11): 2627–2645.
- [26] Mcgonigle B, Bouhidel K, Irish VF. Nuclear localization of the *Arabidopsis APETALA3* and *PISTILLATA* homeotic gene products depends on their simultaneous expression [J]. *Gene Dev*, 1996, 10(14): 1812–1821.
- [27] Smaczniak C, Immink RG, Muiño JM, Blanvillain R, Busscher M, Busscher-Lange J, Dinh QD, Liu S, Westphal AH, Boeren S, Parcy F, Xu L, Carles CC, Angenent GC, Kaufmann K. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development[J]. *Plant J*, 2012, 109(5): 1560–1565.
- [28] Theissen G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(1): 75–85.