

# 一个竹类植物 MADS 盒基因的克隆 及其在拟南芥中的表达

田波 陈永燕 严远鑫 李德铎\*

(中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学开放研究实验室, 昆明 650204; 中国科学院研究生院, 北京 100039; 大连大学生物工程学院, 大连 116622.\* 联系人, E-mail: dzl@mail.kib.ac.cn)

**摘要** 采用 RACE 方法, 从竹类植物麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)幼穗中克隆到一个含完整编码区及 3'端非翻译区的 cDNA, 命名为 *DIMADS18*. 该 cDNA 全长 1039 bp; 编码区共编码 249 个氨基酸, 具有典型的植物 MADS 盒基因结构, 由 MADS 区、I 区、K 区和 C 末端组成. 序列相似性分析结果表明, *DIMADS18* 属于 *AGL6* 亚家族, 其氨基酸序列与水稻(*Oryza sativa* L)的 MADS 盒基因 *OsMADS6* 同源性最高, 序列一致性为 88%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *AGL6* 一致性为 59%. 将 *DIMADS18* 置于 CaMV 35S 启动子控制下在拟南芥中异位表达, 转基因拟南芥表现出叶卷曲、植株矮小、开花时间提前、花聚生于花序顶端等性状, 表明 *DIMADS18* 很可能参与麻竹开花时间的调控.

**关键词** 麻竹 MADS 盒基因 *AGL6* 亚家族 转基因

近十多年来, 植物花发育的分子机理一直是植物分子生物学的热点, 并且已经取得了令人瞩目的进展. 植物的花发育是环境信号与植物内在的遗传机制共同作用的结果. 植物分子生物学的研究表明, 许多相互作用的基因构成一个复杂的网状调控系统, 共同调控植物的花发育过程<sup>[1,2]</sup>. 对模式植物拟南芥的研究发现, 植物的花发育受两类作用机制相反的基因所调控, 即抑制花发育的基因和促进花发育的基因, 它们之间的相互作用决定了植物的开花时间<sup>[1-6]</sup>. 许多 MADS 盒基因的功能与花发育有关, MADS 盒基因编码一类转录调控因子, 是一类调节植物发育的重要基因, 在决定植物开花时间和花形态建成中均起着非常重要的作用<sup>[7-16]</sup>, 典型的植物 MADS 盒基因包含 MADS 区、I 区、K 区和 C-末端 4 个结构域<sup>[17,18]</sup>. 在拟南芥的 MADS 盒基因中, *FLOWERING LOCUS C (FLC)*<sup>[8]</sup>, *SHORT VEGETATIVE PHASE(SVP)*<sup>[9]</sup>, *AGL27*<sup>[19]</sup>等基因抑制成花转变, 它们通过抑制成花途径整合因子 *FT*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1(SOC1)*和 *LEAFY(LFY)*<sup>[11]</sup>等基因的表达而抑制开花, 或者通过延长植物的营养生长而延迟开花; 相反, *SOC1*<sup>[20]</sup>, *APETALA1(API)*<sup>[7]</sup>, *CUALIFLOWER(CAL)*<sup>[21]</sup>, *AGL24*<sup>[12]</sup>等以及大部分 *AGL2* 亚家族基因<sup>[16,22-24]</sup>起着促进开花的作用, 它们在 CaMV 35S 启动子下异位表达都使开花时间提前, 而且它们的突变体都是晚花突变体. 分子系统树分析表明, 植物 MADS 盒基因可以分为 12 个亚家族<sup>[16]</sup>,

*AGL6* 亚家族基因很早以来就被认为是 MADS 盒基因中重要的一支<sup>[16-18]</sup>, 到目前为止, 已经从某些物种中克隆到了一些 *AGL6* 亚家族基因, 但有关这些基因功能的研究报道还很少.

植物分子生物学研究的重要方法之一是在模式植物中取得的研究成果运用于其他植物, 以达到更好地利用植物资源的目的. 竹类植物生长快, 产量高, 经济用途广. 竹类与水稻、小麦等同属禾本科植物, 但在开花习性上有很多独特之处. 竹类是多年生植物, 其绝大多数种 30~60 年甚至是 120 年才开一次花, 而且成片开花成片死亡; 同一种子来源的克隆株不论年龄大小均同步开花, 只有极少数竹类植物是每年开花或周期性开花<sup>[25-29]</sup>. 竹类植物开花的独特性是对竹类植物研究与开发的一个限制因素, 许多研究者依据外部环境的变化予以推测, 提出了各种假说来解释竹类开花现象<sup>[25,29-31]</sup>, 也有一些学者认为竹类开花是由其独特的生物钟所调控, 存在着不同的内在遗传机理<sup>[25,30,31]</sup>. 但到目前为止, 竹类开花现象仍然是植物界的一个难解之谜, 尚无任何从分子水平对竹类植物进行花发育研究的报道. 本研究从麻竹组培诱导开花的幼穗克隆到一个属于 *AGL6* 亚家族的 MADS 盒基因, 并将其转化拟南芥对其功能进行了分析.

## 1 材料与方 法

( ) 材料. 麻竹(*D. latiflorus*)幼穗取自于诱导

开花的麻竹组培苗, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)采用 Columbia (Col)生态型, 大肠杆菌转化的受体为 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为 GV3101. 克隆质粒载体为 pGEM-T, 植物转化的载体质粒为 pWM101 和 pCambia2301.

( ) 麻竹组培苗开花的诱导. 麻竹组培苗的生产参照张光楚等人<sup>[32]</sup>的方法. 组织培养苗诱导开花的培养基以 MS<sup>[33]</sup>培养基为基础, 大量元素浓度降为原浓度的 3/4, VB1 浓度为 5 mg/L, VB6 为 1 mg/L, 烟酸为 1 mg/L. 在含 6 mg/L BA(6-Benzylaminopurine)的培养基中诱导小穗, 在含 3 mg/L BA 以及 0.5 mg/L KT 和 10%椰乳的培养基中改善花的质量.

( ) *DIMADS18* 基因的克隆及其序列分析. 采用 Pharmacia 公司的 mRNA 提取试剂盒提取麻竹幼穗的 mRNA, 用 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 合成用于 RACE 的第 1 链 cDNA. 根据几种单子叶植物 MADS 盒基因的保守序列, 设计了 3'-RACE 简并引物(5'-GCATGGGAGSG-GNAASGTNGASCTSA-3'), 其 5'-端位于基因起始密码子前 2 个碱基处. 采用该引物和 UPM (Universal Primer A Mix)引物对分离麻竹中可能的 MADS 盒基因. 将所得克隆于 ABI310 型测序仪上测序. 序列分析采用 Blast 在线软件及 DNASTAR 软件包, 系统树的构建采用 PAUP 4.0 b10<sup>[34]</sup>.

( ) 表达载体的构建. 根据质粒载体和外源基因的酶切位点, 选择合适的限制性内切酶(*Bam*H 和 *Sal* I), 设计带酶切位点的引物对(DIMB: 5'-TTAAGGATCCATGGGTAGGGGGAACGTGGA-3'和 DIMS: 5'-AAATGTCGACTCAAAGAACCCACCCCAGCA-3'), 从 T-vector 上经 PCR 分离带酶切位点的 DNA 片段. 将质粒 pWM101 上含 CaMV35S 启动子和终止子及多克隆位点的 *Hind* III-*Eco*R 酶切片段插入质粒 pCambia2301 的多克隆位点处, 得到植物转化的中间载体, 把经 *Bam*H 和 *Sal* I 酶切后的 *DIMADS18* 基因克隆入上述中间载体的 *Bam*H 和 *Sal* I 位点之间, 即为植物转化表达载体.

( ) 拟南芥的遗传转化. 运用冻融法将带有 *DIMADS18* 基因的表达载体导入根癌农杆菌 GV3101 中, 筛选抗利福平和卡那霉素的根癌农杆菌. 用浸花法<sup>[35]</sup>浸染拟南芥, 在含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 MS 培养基上筛选种子, 获得转基因拟南芥.

( ) 转基因植物的 Northern 检测. 总 RNA 的提取采用上海华舜公司的 RNAex Reagent & Systems

试剂盒, 根据 *DIMADS18* 基因非保守的 I 区和 C-末端设计 PCR 引物对(5'端引物, 5'-TGCTACAATGCTC-AGCACAACA-3'; 3'端引物, 5'-AAAGAACCCACCC-CAGCAT-3'), 制备 $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP DNA 探针. 20  $\mu$ g 总 RNA 在 1.5%的甲醛变性凝胶上分离, 转到 Hybond N<sup>+</sup>膜上<sup>[36]</sup>, 68 预杂交 15 min, 68 杂交过夜, 68 下洗膜. 洗膜按以下方法进行: 0.5%SDS 的 2 $\times$ SSC 缓冲液中洗 10 min; 0.1%SDS 的 0.5  $\times$  SSC 缓冲液中洗 2 次, 每次 20 min; 0.1%SDS 的 0.1  $\times$  SSC 中洗 20 min.

## 2 结果

### 2.1 *DIMADS18* 基因的克隆与序列分析

在 3'-RACE 得到的大量克隆中, 有一个阳性克隆命名为 *DIMADS18*, 它由 1039 bp 组成, 具有完整的 ORF 区、3'UTR 区和 Poly(A)尾巴, 不含 5'UTR 区. ORF 区编码 249 个氨基酸, 具有典型的植物 MADS 盒基因的结构, 其编码肽链包含 2 个保守区(MADS 盒和 K 区)和 2 个非保守区(I 区、C 末端)(图 1), 氨基酸序列与来自其他单子叶植物的某些 MADS 盒基因高度同源, 与水稻 *OsMADS6*, 玉米 *ZAG3* 及 *ZAG5*, 大麦 *HvAGL6*, 小麦 *TaMADS12*, 早熟禾 *PaMADS1*, 毒麦 *LpMADS4* 和兰花 *OMADS1* 的一致性(identity)分别为 88%, 84%, 82%, 86%, 86%, 87%, 87%和 63%, 与拟南芥 *AGL6* 的一致性为 59% (图 2). 与其他物种 MADS 盒基因构建的系统树表明, *DIMADS18* 基因属于 *AGL6* 亚家族(图 3) (*DIMADS18* 的 GenBank 登录号为 AY599755).

### 2.2 植物表达载体的构建

本实验所用载体 pCambia2301 含有新霉素磷酸转移酶(*neomycin phosphotransferase*, NPT II)基因和 GUS 报告基因, 具有卡那霉素(*Kanamycin*)抗性, 在 pCambia2301 的 *Hind* III 和 *Eco*R 位点间插入 CaMV35S 启动子和 35SpolyA(来源于载体 pWM101)调控下的 *DIMADS18* 编码区, 得到 *DIMADS18* 的植物表达载体(图 4).

### 2.3 *DIMADS18* 基因在拟南芥中的异位表达

将 *DIMADS18* 的编码区置于 CaMV35S 启动子的调控下转化拟南芥, 收获经根癌农杆菌浸染后的拟南芥的种子, 经卡那霉素抗性筛选, 得到转基因植株 21 株, 其中有 3 株表型与野生型无明显差异, Northern

```

1 ATGGGTAGGGGAACGTGGAGCTGAAGCGCATCGAGAACAAGATCAACCGCGAGGTACC
  M G R G N V E L K R I E N K I N R Q V T 20
61 TTCTCCAAGCGCCGCAACGGCCTCCTCAAGAAGGCTACGAGCTGTGGTCTCTCCGAC
  F S K R R N G L L K K A Y E L S V L C D 40
121 GCGGAGTTCGCGCTCATCATCTTCTCCAGCCGGCGCAAGCTCTACGAGTTCGGCAGCGCC
  A E V A L I I F S S R G K L Y E F G S A 60
181 GCCATAAGTAAACATTAGAAAGATATCAACACTGCTGCTACAAIGCTCAGGACAACAAT
  G I S K T L E R Y Q H C C Y N A Q D N N 80
241 GCACTGTCTGAAACTCAGATCTGGTACCAGGAAATGCCGAAGCTAAGGGCAAAATTCGAA
  A L S E T Q I W Y Q E M F K L R A K F E 100
301 GCTTTGCAGCGCACTCAGAGGCATTTACTCGGGGAGGATCTTGGACCGCTCAGCGTAAAA
  A L Q R T Q R H L L G E D L G P L S V K 120
361 GAACTGCAGCAGCTGGGAAACAGCTAGAATGTGCTCTCTCACAGGCAAGACAGCGAAAG
  E L Q Q L E K Q L E C A L S Q A R Q R K 140
421 ACACAACCTATGATGGAGCAACTGGAGGAACTTCGCAAGAAGGAGCGTCAGTTGGGAGAA
  T Q L M M E Q V E E L R K K E R Q L G E 160
481 ATTAACAGGCAACTCAAGCACAAGCTCGAGGCTGAAGGTAGCAGCAACTATAGAGCCATG
  I N R Q L K H K L E A E G S S N Y R A M 180
541 CATCAGGCCTCCTGGGCTCCTGGCACCGTCCTGGATGAAGGCGCCGCATATCATGTCCAG
  H Q A S W A P G T V V D E G A A Y H V Q 200
601 CAGCCTCCTCACTCCGCTGCTGACTGTGAACCACCCACTCTGCAAATGGGTATCCG
  Q P P H S A A L D C E P P T L Q I G Y P 220
661 CACCAATTTATGCCTCCTGAGGCGCCAAACATTCAGGAAGCGCCCGAGCCGGAGGGAG
  H Q F M P P E A A N I P G S A P A G G E 240
721 AACAACTTCATGCTGGGGTGGGTTCTTTGAACAACCTTCATGCTGGATCAGTCGAAAGTTG
  N N F M L G W V L * 249
781 AACTAATAAAAAGCGCGCGTGTGCAGTGTACATGCATCTGCATGCATGCCTACCTGAT
841 CAAGGCCTCGCGTGGCCCTTGCTTAATTAGTTGTTGCTGIGTGTAAGAAGCTGCACCTTAA
901 TTTGTTCTATGTGGTGTGTCTAGTGTGTAAGTCTTATGTTTGTGATTTGAACATCGATC
961 TTGTAAGATACTTCTAAGCTGCCATGCATGCAAGTTATCTAGACTGGTACTTATCAAAA
1021 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图1 *DIMADS18*的核苷酸及氨基酸序列  
双划线示 MADS 区, 单划线示 K 区

		M (%)	
(a)			
DLMADS18	GRGNVELKR IENKINRQVT FSKRRNGLLK KAYELSVLCD AEVALIIFSS RGKLYEF	100	
HvAGL6	***R****	98	
LpMADS4	***R****	98	
TaMADS12	***R****	98	
OsMADS6	***R****	98	
PaMADS1	***R****	98	
ZAG3	***R****	98	
ZAG5	***R****	96	
OMADS1	***R****	91	
AGL6	***R**M**	96	
(b)		K (%)	O (%)
DLMADS18	QEMPKLRAK FEALQRTQRH LLGEDLGPLS VKELQLEKQ LECALSQARQ RKTQLMMEQV EELRKE	100	100
HvAGL6	***S**K**	94	86
LpMADS4	***S**K**	94	87
TaMADS12	***S**K**	92	86
OsMADS6	H**S**K**	94	88
PaMADS1	***S**K**	92	87
ZAG3	***S****	95	84
ZAG5	***S****	94	82
OMADS1	**LS**K** Y*S**S**	70	63
AGL6	**VT**KS* Y*S**V**N*N	67	59

图2 *DIMADS18*的氨基酸序列与其他物种MADS区蛋白的同源性比较  
(a) MADS 区(M)同源性比较; (b) K 区(K)和氨基酸序列全长(O)同源性比较

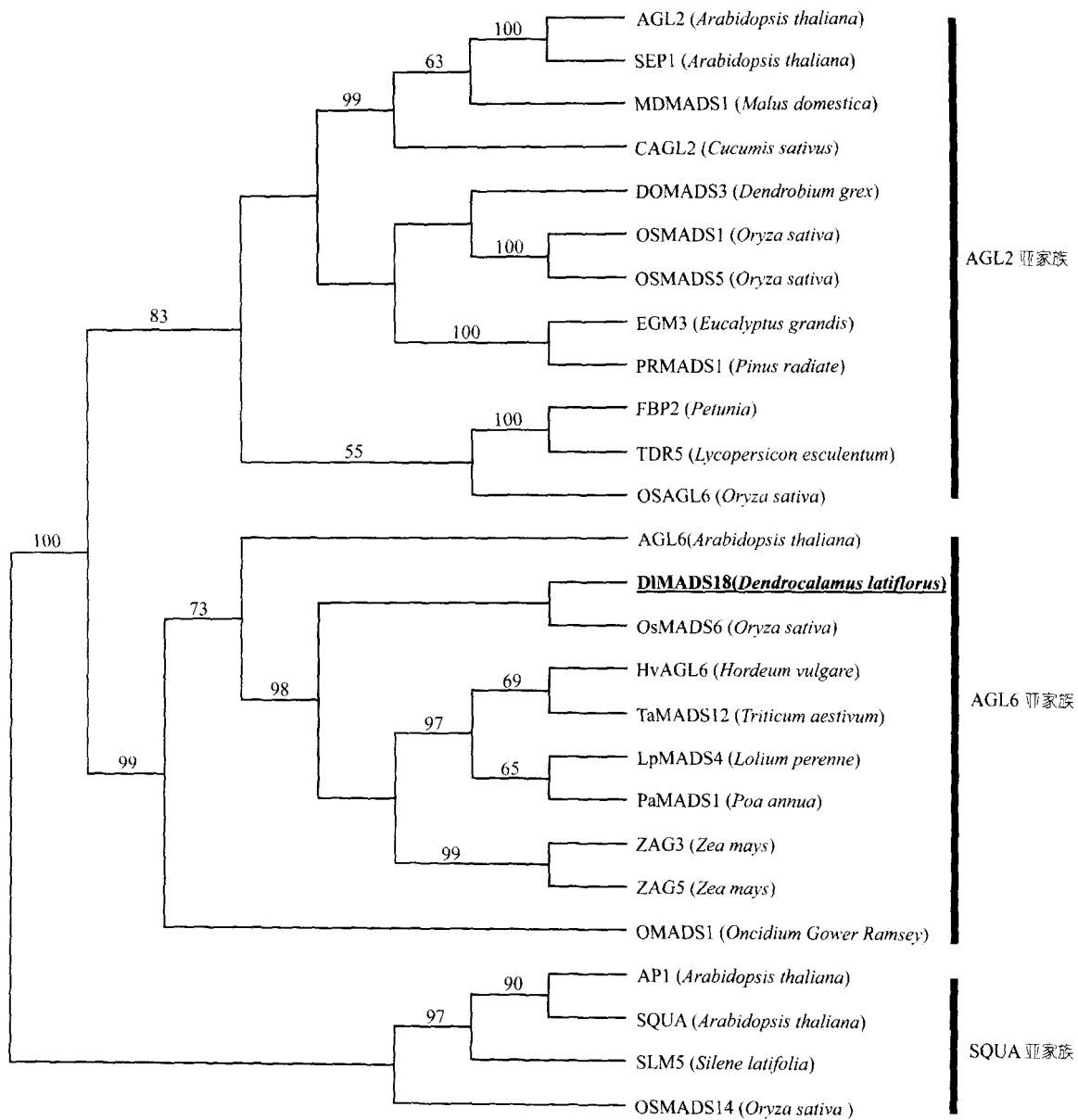


图3 基于MADS盒基因氨基酸全序列构建的系统树  
 DIMADS18与AGL6及其他AGL6-like基因聚在一支, DIMADS18由下划线标出, 每个MADS盒基因的物种名称标注在相应基因名称后, 每个支上的数字表示1000次重复搜索的靴带值

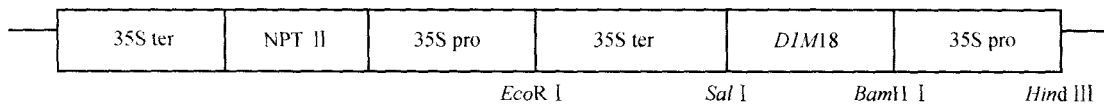


图4 用于植物转化的含DIMADS18基因的表达载体构建图

杂交检测不到明显的杂交信号(图6), 其余18株均表现出基本一致的表型变化, DIMADS18的表达量很高(图6), 主要表现在: ( )种子萌发后形成几无柄

且向内卷曲的叶(图5(a)), 而野生型植株的叶柄细长, 叶片圆形(图5(b)); ( )植株矮小, 开花时间明显提前, 仅6~8片莲座状叶时便开始抽苔(图5(c)), 但同时

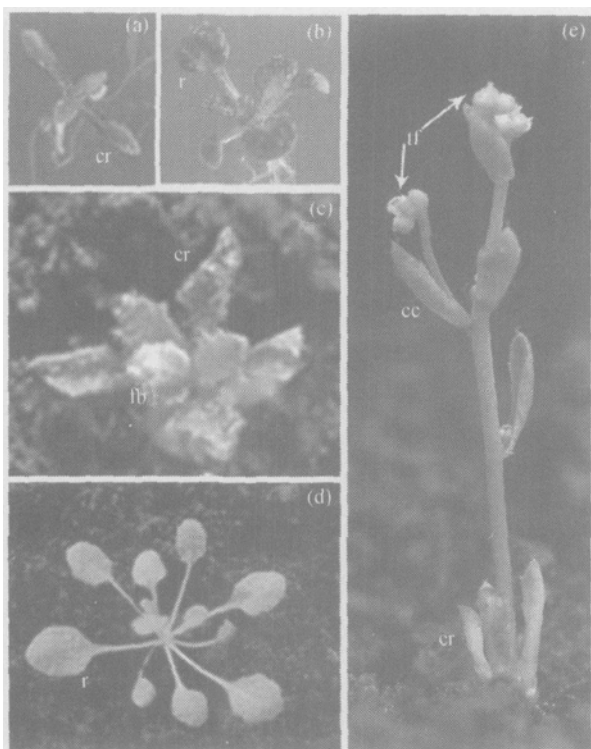


图5 转基因拟南芥的表型分析

(a) MS培养基上生长12 d的35S : *DIMADS18*拟南芥, cr示卷曲的莲座状叶; (b) MS培养基上生长12 d的野生型拟南芥, r示圆形的莲座状叶; (c) 生长18 d的35S : *DIMADS18*拟南芥, fb示花蕾; (d) 生长18 d的野生型拟南芥, 仍处于旺盛的营养生长期; (e) 移栽在土壤中的35S : *DIMADS18*拟南芥, tf示顶生花, cc示卷曲的茎生叶

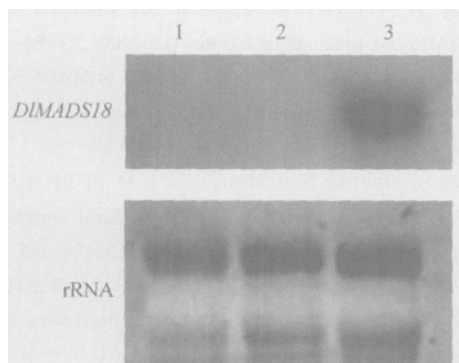


图6 *DIMADS18* 基因转化拟南芥的 Northern 杂交分析  
1 示 野生型; 2 示似野生型植株; 3 示高表达植株

的野生型植株有莲座状叶 11~15 片, 且仍处于旺盛的营养生长阶段(图 5(d)); ( ) 所有的花均聚生于花序顶端, 花小但花的结构没有变化, 茎生叶卷曲似花萼状(图 5(e)).

### 3 讨论

竹类植物是具有重要经济价值的单子叶植物. 为了探讨 MADS 盒基因在竹类植物花发育中的作用, 我们从麻竹幼穗中克隆了一个麻竹 MADS 盒基因

*DIMADS18*, 对其序列同源性进行了分析, *DIMADS18* 与其他 *AGL6* 亚家族基因同源性很高(图 2), 属于 *AGL6* 亚家族(图 3). MADS 盒基因的分子系统树分析表明, *AGL6* 亚家族基因与 *AGL2* 亚家族基因和 *SQUA* 亚家族基因聚为一支<sup>[16,37]</sup>.

迄今为止, 在裸子植物和被子植物中都克隆到了 *AGL6* 亚家族基因, 表达模式分析表明, 该类基因主要在花器官中表达, 可能与植物的花发育有关. 如 *AGL6* 在拟南芥的四轮花器官中均有表达<sup>[38]</sup>, *AGL13* 局限于胚珠表达<sup>[39]</sup>; *ZAG3* 在玉米的雌雄花序及心皮均有表达<sup>[40]</sup>; *GGM9* 和 *GGM11* 在买麻藤的大小孢子叶球表达, 在营养叶中无表达<sup>[41]</sup>; *OMADS1* 在兰花的花序分生组织、花梗及心皮均有表达<sup>[42]</sup>. 由于尚无 *AGL6* 亚家族基因相关突变体的研究报道, *AGL6* 亚家族基因的确切功能还不能确定. 最近, 从一种兰科栽培植物(*Oncidium* 'Gower Ramsey')和欧洲云杉(*Picea abies*)中克隆了 2 个 *AGL6* 亚家族基因, 分别是 *OMADS1*<sup>[42]</sup>和 *DALI*<sup>[43]</sup>, 并对其功能进行了研究. 35S : *DIMADS18* 转基因拟南芥的表型与 35S : *OMADS1* 及 35S : *DALI* 的有很多相似之处, 如开花时间明显提前、产生顶花、植株矮小、叶卷曲(图 5), 这些表型是大多数 *AGL2*-/*AGL6*-/*SQUA* 亚家族基因异位表达所共有的<sup>[7,21,44~49]</sup>. 从现有的研究结果可以初步推测, 这些 MADS 盒基因在功能上有一定的相似性. Jeon 等人<sup>[50]</sup>通过对水稻 *OsMADS1* 的研究发现, 缺失 C-末端的 *OsMADS1* 突变体的转基因水稻表现出开花早、植株矮小的特征, 而缺失 MADS 区的 *OsMADS1* 突变体的转基因水稻没有表型变化, 因此得出结论, MADS 区是导致提前开花和植株矮小的关键所在, 而 C-末端对这 2 个表型的产生是不必要的, C-末端可能对 MADS 区蛋白在某些特异功能上是必需的. Hsu 等人<sup>[42]</sup>对 *Oncidium* 'Gower Ramsey' 的 *AGL6* 亚家族基因 *OMADS1* 的研究发现, 在 35S : *OMADS1* 转基因植株中, 促进成花转变的基因 *FT*, *SOC1* 以及花分生组织决定基因 *LFY* 和 *API* 的表达量都比野生型对照增加, 因此转基因植株开花时间提前. Tzeng 等人<sup>[21]</sup>在研究百合的 *AGL2* 亚家族基因 *LMADS3* 和 *LMADS4* 时也得到同样的结论. 我们从麻竹中克隆的 MADS 盒基因 *DIMADS18* 在拟南芥中可能也存在同样的作用机理, 因而产生了与一些 *AGL2*-/*AGL6*-/*SQUA* 亚家

族基因异位表达相似的表型变化。总之, *DIMADS18* 很可能参与麻竹开花时间的调控。一个物种中一般有多个不同的 *AGL2* 亚家族基因, *AGL2* 亚家族基因的编码蛋白之间可能存在功能冗余<sup>[51]</sup>, 单基因的突变或高表达一般只能导致少数表型性状的变化<sup>[52]</sup>。与 *AGL2* 亚家族基因一样, 同一物种中的 *AGL6* 亚家族基因也不是惟一的<sup>[16]</sup>, 因此 *AGL6* 亚家族基因的编码蛋白之间或与 *AGL2* 亚家族基因的编码蛋白之间可能也存在功能冗余。 *DIMADS18* 与一些 *AGL2*-/*AGL6*-/*SQUA* 亚家族基因一样<sup>[44-46]</sup>, 异位表达对花器官的发生没有影响, 但麻竹中是否还存在其他的 *AGL6* 亚家族基因, 还有待于进一步的研究。

对于大多数植物而言, 细胞分裂素促进成花转变, 内源细胞分裂素的增加可以减弱苹果的营养生长, 促进开花<sup>[53]</sup>。高浓度的 BA 处理导致双色金光菊 (*Budbeckia bicolor*) 茎矮化, 幼叶卷曲, 花苞形成后停止 BA 处理, 将阻止花苞的开放<sup>[54]</sup>。 *DIMADS18* 基因从麻竹组培苗幼穗中克隆, 麻竹组培苗诱导开花是在高浓度的细胞分裂素 BA 的作用下完成的, 其表型的相似性说明 BA 促进了 *DIMADS18* 及其功能类似基因的表达, 从而促进开花。

本研究首次利用分子生物学方法研究竹子开花现象, 为下一步研究竹类植物花发育的机理打下了基础, 同时为进一步研究 *AGL6* 亚家族基因的功能提供了证据。植物开花是一个受多基因调控的复杂事件, 运用分子生物学方法研究竹类植物的开花现象将是一个漫长而艰难的探索过程, 下一步的研究工作需要建立更加完善的麻竹组培体系, 进一步研究麻竹在不同环境条件下的基因表达及各基因之间相互关系。

致谢 广东省林科院张光楚教授惠赠麻竹组培苗, 中国科学院西双版纳热带植物园余迪求博士在实验中给予了帮助并对本文提出了修改意见, 在此表示感谢。本工作为国家自然科学基金 (批准号: 30200015) 和云南应用基础研究基金 (批准号: 2002C0056M) 资助项目。

### 参 考 文 献

- 1 Levy Y Y, Dean C. The transition to flowering. *Plant Cell*, 1998, 10: 1973-1989
- 2 Blázquez M A. Flower development pathways. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3547-3548
- 3 Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 2002: S111-S130
- 4 Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant*

- Cell, 2004, 16: S1-S17
- 5 Boss P K, Bastow R M, Mylne J S, et al. Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, 2004, 16: S18-S31
- 6 Simpson G G, Dean C. *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science*, 2002, 296: 285-289
- 7 Mandel M A, Yanofsky M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature*, 1995, 337: 522-524
- 8 Michaels S D, Amasino R M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 1999, 11: 949-956
- 9 Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, et al. Molecular cloning of *SVP*: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2000, 21: 351-360
- 10 Lee H, Suh S S, Park E, et al. The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2000, 14: 2366-2376
- 11 Sheldon C C, Rouse D T, Finnegan E J, et al. The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3753-3758
- 12 Yu H, Xu Y, Tan E L, et al. *AGAMOUS-LIKE 24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16336-16341
- 13 Borner R, Kampmann G. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2000, 24(5): 591-599
- 14 Theißen G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 75-85
- 15 Ng M, Yanofsky M. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Gen*, 2001, 2: 186-195
- 16 Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 464-489
- 17 Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev*, 1991, 5: 484-495
- 18 Theißen G, Kim J, 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. *J Mol Evol*, 1996, 43: 484-516
- 19 Ratcliffe O J, Nadzan G C, Reuber T L, et al. Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiol*, 2001, 126: 122-132
- 20 Samach A, Onouchi H, Gold S E, et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, 2000, 288: 1613-1616
- 21 Kempin S A, Savidge B, Yanofsky M F. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*, 1995, 267: 522-525
- 22 Mandel M A, Yanofsky M F. The *Arabidopsis AGL9* MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sex Plant Reprod*,

- 1998, 11: 22~28
- 23 Tzeng T Y, Hsiao C C, Chi P J, et al. Two lily *SEPALLATA*-like genes cause different effects on floral formation and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1091~1101
- 24 Simon T M, Elizabeth A K. Heterogeneous expression patterns and separate roles of the *SEPALLATA* gene *LEAFY HULL STERILE1* in grasses. *Plant Cell*, 2004, 16: 1692~1706
- 25 Janzen D H. Why bamboos wait so long to flower? *Ann Rev Ecol Syst*, 1976, 7: 347~391
- 26 Sharma M L. The flowering of bamboo: Fallacies and Facts. *Bamboo in Asia and the Pacific*. Thailand: Chiangmai, 1994. 68~70
- 27 Ueda K. Studies on the physiology of bamboo, with references to practical application. Tokyo, Prime Minister's Office, 1960, 167.
- 28 Nelson B W. Natural forest disturbance and change in the Brazilian Amazon. *Remote Sensing Reviews*, 1994, 10: 105~125
- 29 Franklin D C. Synchrony and asynchrony: Observations and hypotheses for the flowering wave in a long-lived semelparous bamboo. *J Biogeography*, 2004, 31(5): 773~786
- 30 Keeley J E, Bond W J. Mast flowering and semelparity in bamboos: The bamboo fire cycle hypothesis. *American Naturalist*, 1999, 154: 383~391
- 31 Wong K M. Flowering, fruiting and germination of the bamboo *Schizostachyum zollingeri* in Perlis. *Malaysian Forester*, 1981, 44: 453~463
- 32 张光楚, 陈富枢, 王裕霞. 麻竹离体快速繁殖技术的研究. *竹子研究汇刊*, 1993, 12(4): 7~15
- 33 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~479
- 34 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10. Sinauer Associates Massachusetts, USA, 2001
- 35 Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis Thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735~743
- 36 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Harbor Laboratory Press, 2002, 540~544, 721~725
- 37 Theißen G, Becker A, Di Rosa A, et al. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 115~149
- 38 Mouradov A, Glassick T V, Hamdorf B A, et al. Family of MADS-box genes expressed in early male and female reproductive structures of Monterey Pine. *Plant Physiol*, 1998, 117: 55~61
- 39 Rounsley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 1995, 7: 1259~1269
- 40 Mena M, Mandel M A, Lerner D R, et al. A characterization of the MADS-box gene family in maize. *Plant J*, 1995, 8: 845~854
- 41 Winter K U, Becker A, Münster T, et al. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7342~7347
- 42 Hsu H F, Huang C H, Chou L T, et al. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(8): 783~794
- 43 Carlsbecker A, Tandre K, Johanson U, et al. The MADS-box gene *DALI* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J*, 2004, 40: 546~557
- 44 Chung Y Y, Kim S R, Finkel D, et al. Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 657~665
- 45 Kang H G, An G. Isolation and characterization of a rice MADS box gene belonging to the *AGL2* gene family. *Mol Cells*, 1996, 7: 45~51
- 46 Kang H G, Jang S, Chung J E, et al. Characterization of two rice MADS box genes that control flowering time. *Mol Cells*, 1997, 7: 559~566
- 47 Kyoizuka J, Harcourt R, Peacock W J, et al. *Eucalyptus* has functional equivalents of the *Arabidopsis API* gene. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 573~584
- 48 Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 2001, 409: 525~529
- 49 Pelaz S, Gustafson-Brown C, Kohalmi A E, et al. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J*, 2001, 26: 385~394
- 50 Jeon J S, Jang S, Lee S, et al. *leafy hull sterile1* is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. *Plant Cell*, 2000, 12: 987~884
- 51 Savidge B, Rounsley S D, Yanofsky M F. Temporal relationships between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell*, 1995, 7: 721~733
- 52 Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 2000, 405: 200~203
- 53 Sedgley M. Flowering of deciduous perennial fruit crops. *Hort Rev*, 1990, 12: 223~264
- 54 Kochankov V G, Milyaeva E L, Zhyvukhina E A, et al. Effect of 6-Benzylaminopurine on stem formation and flower bud initiation in *Budbeckia bicolor* plants of different ages under non-inductive conditions. *Acta Horticulturae*, 1989, 251.

(2004-09-10 收稿, 2004-12-24 收修改稿)