

研究报告 Original Papers

牡丹开花调控转录因子基因*PsFUL1*的克隆与表达分析位伟强^{1,2}, 刘伟^{1,2}, 段亚宾^{1,2}, 郭丽丽^{1,2}, 张利霞^{1,2}, 郭大龙^{2,3,*}, 侯小改^{1,2,*}¹河南科技大学农学院/牡丹学院, 河南洛阳471003; ²河南省油用牡丹工程技术研究中心, 河南洛阳471003; ³河南科技大学林学院, 河南洛阳471003

摘要:以‘洛阳红’牡丹为试验材料, 采用RT-PCR方法从其花芽中克隆得到1个开花调控重要转录因子基因*FRUITFULL* (*FUL1*)的同源基因, 其cDNA开放阅读框长度为768 bp, 编码255个氨基酸。序列比对和结构域分析表明, 此蛋白具有MADS超家族、K-box超家族的结构域和ARG80多结构域, 且具有MADS-box和K-box的稳定保守基序。NCBI blast分析发现克隆得到的氨基酸序列与葡萄中的FUL类蛋白具有较高同源性, 为69%。因此将其命名为*PsFUL1*, GenBank登录号为KX621277。系统进化树分析表明, *PsFUL1*与葡萄编码的*VvFUL1*亲缘关系最近, 属于MADS基因家族中的*API/FUL*亚家族。qRT-PCR表明, *PsFUL1*基因在‘洛阳红’牡丹不同组织中表达差异显著, 在花芽和花瓣中的表达量最高, 苞片和叶片次之, 根中最少。在不同品种牡丹(早花‘迎日红’、中花‘洛阳红’、晚花‘花王’)的6个不同开花时期的花瓣中, *PsFUL1*基因表达量因花期早晚与开花时期不同而差异显著, 表明*PsFUL1*基因对牡丹开花及花期的早晚有重要调控作用。

关键词:牡丹; *PsFUL1*; 不同花期; 基因表达量

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科(*Paeoniaceae*)芍药属(*Paeonia*)牡丹组落叶小灌木, 因其花型硕大、花色艳丽, 被誉为“花中之王”(李嘉珏等2011)。牡丹是多年生木本花卉, 自然花期相对较短, 一般开花时间为每年的4~5月初, 单株花期约为10 d, 影响其观赏性和经济效益。我国牡丹品种多以中花品种为主, 早、晚花品种相对较少。因此, 深入研究牡丹开花的分子机理, 对牡丹花期调控、延长牡丹开花时间具有重要意义。

目前广为接受的ABCDE开花模型是通过拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和金鱼草(*Antirrhinum majus*)等模式植物花器官发育的研究而被提出并逐步得到完善(Melzer等2009; Saha等2015; Wang等2015)。在花发育的ABCDE模型中, 控制萼片和花瓣发育所必需的基因是A类基因(Jack 2004)。APETALA1(*API*)/*FRUITFULL*(*FUL*)-like基因是MADS-box基因家族中的A类基因。已有研究表明*FUL*基因对控制拟南芥开花时间和花分生组织分化有重要作用(Borner等2000; Teper-Bamnlker和Samach 2005)。在葡萄(*Vitis vinifera*)中, *VvFUL1*基因不仅能促进葡萄藤卷须的分化和发育, 而且能调控花器官的发育(Calonje等2004)。目前已从金鱼草、桃(*Amygdalus persica*)、蕙兰(*Cymbidium faberi*)、球花石斛(*Dendrobium thyrsoflorum*)和荷花(*Nelumbo nucifera*)等多种植物中分离克隆了*FUL*同源基因, 并且对其表达模型及功能开展了相

关研究(陈岳等2015), 但对于重要观花植物—国花牡丹, 关于*FUL*基因的研究鲜有报道。因此, 研究牡丹开花途径中的关键基因, 有利于促进牡丹花期自由调控, 具有重要的园艺应用价值。

本研究以‘洛阳红’牡丹为试验材料, 利用RT-PCR方法克隆得到了*FUL1*基因的全长cDNA序列, 采用实时荧光定量PCR方法探讨*FUL1*基因在‘洛阳红’牡丹不同器官中的表达情况, 并进一步研究了*FUL1*基因在不同花期牡丹品种(早花‘迎日红’、中花‘洛阳红’和晚花‘花王’) 6个开花时期的花瓣中的表达情况, 为研究牡丹*API/FUL*同源基因的功能及其在牡丹成花转变与开花过程中的作用奠定基础, 为揭示牡丹花期早晚的分子机理与花期调控研究提供理论依据。

材料与方法

1 试验材料

2015年10月中旬采集‘洛阳红’牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr. ‘Luoyanghong’)的花芽, 2016年4月采集其盛花期的花瓣、苞片、根和叶, 同时采

收稿 2016-10-27 修定 2017-03-02

资助 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN014)、国家自然科学基金(31370697)和河南省科技创新杰出人才基金(164200510013)。

* 共同通讯作者(E-mail: grapeguo@126.com; hxg382@126.com)。

集开花时间不同的牡丹品种早花‘迎日红’(‘Yingrihong’)、中花‘洛阳红’、晚花‘花王’(‘Huawang’) 6个开花时期的花瓣。6个开花时期包括露色期(I)、绽口期(II)、初开期(III)、半开期(IV)、盛开期(V)和始衰期(VI) (王荣花等2005)。将采集样品分装、液氮速冻后,置于-80°C冰箱保存备用。样品采集地点为洛阳国家牡丹园。

2 总RNA提取与cDNA合成

试验材料总RNA提取采用北京天根生化科技有限公司提供的RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒。利用Nanodrop 2000 C微量分光光度计进行质量检测,其OD₂₆₀/OD₂₈₀值均在1.8~2.0之间,质量满足试验需求。取1 μg高质量的RNA,利用OligdT和随机引物合成cDNA链,具体步骤参照HiScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

3 引物设计与PCR反应体系

基于‘洛阳红’牡丹转录组信息及NCBI数据库平台,通过BLASTX分析比对,利用Primer 5.0软件设计1对可以扩增*PsFUL1*完整开放阅读框(ORF)的正、反向引物,PsFUL1F: 5' AAAGAAGAAA-CTCCTGCCACAT 3'; PsFUL1R: 5' ATCCAAAAA-CACATTCAAACC 3'。以‘洛阳红’花芽反转录的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为20 μL。94°C预变性5 min; 94°C变性50 s, 60°C退火50 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C延伸8 min。采用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,选取目的条带回收、纯化后连接到TaKaRa的pMD-18T载体上(TaKaRa code: D101A, 大连),经过遗传转化,将重组质粒转化到大肠杆菌DH5α中。通过菌液PCR筛选阳性克隆,并随机选取3个阳性克隆送至北京英威捷基公司测序。

4 序列分析与系统进化树的构建

根据测序结果利用DNAMAN软件查找相关引物序列去掉载体,利用NCBI的Conserved Domains在线软件进行结构域分析;利用BLASTX进行在线同源序列分析,用ORF Finder在线查找牡丹*PsFUL1*基因cDNA的开放阅读框;利用Expasy (<http://www.expasy.org/proteomics/>)提供的ProtParam对蛋白质理化性质进行分析,利用NetSurfP软件分析蛋白质的二级结构,并利用ProtScale进行

氨基酸亲疏水性分析;最后使用MEGA 5.0构建系统进化树。具体步骤参考Wang等(2011)的报道。

5 实时定量PCR反应

设计1对引物qPsFUL1F: 5' TGCTA-CAAAAAGAAAGAAGAAA 3', qPsFUL1R: 5' TCAATGACAAAATGAAAACCCT 3',其扩增长度为136 bp。选择表达相对稳定的*Actin*基因作为内参基因(张玉喜等2011;王顺利等2014),qActinF: 5' GGTCTATTCTTGCTTCCCTCAG 3', qActinR: 5' GAACTCACTATCAAACCCTCCAG 3',扩增长度为134 bp。qRT-PCR反应体系为20 μL。94°C预变性3 min; 94°C变性15 s, 55°C复性15 s, 72°C延伸20s, 40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算*PsFUL1*基因的相对表达量(Livak和Schmittgen 2001)。每个PCR反应重复3次。

实验结果

1 牡丹*PsFUL1* cDNA全长的克隆与序列分析

以‘洛阳红’牡丹花芽cDNA为模板,克隆得到1个768 bp大小的含有完整开放阅读框的cDNA序列,编码255个氨基酸(图1)。将核苷酸序列进行BLAST比对分析,发现该片段与*API/FUL*基因相似性较高。对其编码蛋白进行结构域分析,发现该基因具有MADS超家族、K-box超家族的结构域和ARG80多结构域,其中MADS超家族结构域又分为MADS-MEF2-Like结构域、MADS结构域和SRF-TF结构域。BLASTP分析结果表明,该基因与八仙花(*Hydrangea macrophylla*)的*API/FUL*类蛋白、光皮桦(*Betula luminifera*)的*MADS1*、葡萄的*FUL*类蛋白具有较高的同源性,相似度分别达65%、66%、69%。这些数据表明该基因属于*API/FUL*类蛋白,具有促进花序分生组织分化,调控植物开花的作用。因此将该基因命名为*Ps-FUL1*, GenBank登录号为KX621277。

运用Expasy提供的ProtParam在线预测*Ps-FUL1*编码的蛋白质理化性质,推测该蛋白的分子式为C₁₂₆₉H₂₀₈₆N₃₈₆O₃₉₀S₉,相对分子量约为29.279 kDa,理论等电点为9.49。运用在线工具对*PsFUL1*编码的蛋白的亲疏水性进行分析,结果表明,*Ps-FUL1*大部分区域为亲水性氨基酸(198个),亲水区域主要集中在51~210 aa之间,亲水性可达-3.578,

```

1  ATGGGGAGGGGAAGAGTTCAGCTGAAGCGGATCGAGAACAAGATTAGTCGGCAAGTTACCTTCTCAAACACGGACT
1  M G R G R V Q L K R I E N K I S R Q V T F S K R R T
79  GGATTATTGAAGAAAGCTCATCAAATCTCGGTGCTATGCGATGTGGAGGTGCTTTAATTGTCTTCTACTAAAGGA
27  G L L K K A H Q I S V L C D V E V A L I V F S T K G
157  AAACCTATGAGTATTCTCTGAATCCAGCATGGAAAGGATCCTGGAACGATACGAGAGGTACTCGTATGCAGAGAAA
53  K L Y E Y S S E S S M E R I L E R Y E R Y S Y A E K
235  CAGCTTGGAAACAATTGATCCCGAATCACAGGGGAAGCTGGTCTCATGATACCCGAAGCTAGTAGCCAGGATTGAAGTC
79  Q L G T I D P E S Q G S W S H E Y P K L V A R I E V
313  TTGCAAGGAGCATGAGGCACATTTCCGGGAGAAGAGCTTGATCCCTTGAGTTTGGAGAGGCTTCAAATTTGGAGCAA
105  L Q R S M R H I S G E E L D P L S L R E L Q N L E V
391  CAACCTGATAGTCTTAAAGCGCGTGCAGAACAAAGAAACCAACTTATGAATGAACCATCTCCGAGTTTCAGAAA
131  K E K A L Q E Q N N L L A K K L K Q N D K I N A D Q
469  AAGGAAAAGCCCTTGCAGGAGCAAAACAATTTGTAGCAAAAGAGCTCAAGCAGAATGACAAGATTAAATGCTGATCAA
157  K E K A L Q E Q N N L L A K K L K Q N D K I N A D Q
547  CGCACACAAGGCAGCAGCAGCAAGACCTGGTCAAAACTCATCTGCATTGATGCTAGCACCACCACACAGCCT
183  R T Q R Q Q Q Q Q D H G Q N S S A L M L A P P Q Q P
625  CCTGCATCACTACCAGTTGCTTTGTTTAAACATCGGGCAACGCTTGAAGGTGGGTGTGGTGTAGTCGAAGATGTGGGA
209  P A S L P V A C L N I G Q R L E S G G C G V V E D V G
703  CATCAAACCTCAACGTACATCGCATATAGTTCCTCCCTTGGATGCTTCTAATTTAAACACATAA
235  H Q T Q R T S H I V L P P W M L P N L N T *

```

图1 *PsFUL1*基因的ORF序列及推导的氨基酸序列Fig.1 The ORF sequence and deduced amino acid sequence of *PsFUL1*

疏水性氨基酸有49个,疏水性可达2.356,总和为-193.122,因此推测该基因编码的蛋白为亲水蛋白。运用NetSurfP对*PsFUL1*蛋白质序列的二级结构进行预测,预测结果表明*PsFUL1*蛋白质序列的二级结构主要由 α 螺旋(39.73%)、 β 转角(24.24%)和无规则卷曲(36.03%)构成。*PsFUL1*编码的蛋白包含更多的 α 螺旋和无规则卷曲,*PsFUL1*则通过介导蛋白质之间的相互作用来调控目标基因的表达(Yang等2003)。

2 牡丹*PsFUL1*编码氨基酸的同源性分析

将*PsFUL1*氨基酸序列提交至NCBI数据库进行在线BLAST比对,选择13个同源性较高的物种的15条*API/FUL*亚家族氨基酸,运用DNAMAN软件将这些序列进行比对后发现:*PsFUL1*与不同植物*API/FUL*亚家族氨基酸序列的同源性不同,与葡萄、八仙花、光皮桦具有较高的同源性,与葡萄的FUL类蛋白(AAT07448.1)的同源性最高,为69%,*API/FUL*亚家族具有MADS和K-box高度保守的结构域(图2),属于MADS基因家族中的TypeII型(Alvarez-Buylla等2000),推断*PsFUL1*是具有生物学功能的FUL同源基因。

3 牡丹*PsFUL1*系统进化分析

为了探讨牡丹*PsFUL1*基因与其它植物*API/*

*FUL*同源基因之间的系统进化关系,选取13个物种的15条*API/FUL*同源基因编码的氨基酸序列,利用MEGA 5.0软件构建系统进化树。结果(图3)表明,*PsFUL1*与其他物种编码的FUL-like蛋白聚到一起,且与葡萄中的VvFUL1聚在一起,这进一步验证了*PsFUL1*基因属于*API/FUL*亚家族,表明牡丹与葡萄的亲缘关系最近。

4 *PsFUL1*在牡丹不同组织器官中的表达分析

以‘洛阳红’牡丹为试材,基于Duncan Test和方差分析(ANOVA)比较分析了*PsFUL1*基因在不同组织器官中的表达差异情况。*PsFUL1*在牡丹花芽、花瓣、苞片、叶和根中均有表达,但表达量差异显著($P<0.05$),呈现逐次降低的变化趋势(图4)。*PsFUL1*在花芽中的表达量最高,为17.23;花瓣中的表达量次之,为13.66;苞片和叶片中的表达量几乎在同一水平,分别为9.43和8.21;根中的表达量最少,为1.00。表达量最高的花芽中表达量约是表达量最低的根的17倍。推测在牡丹正常的成花转变过程中,*PsFUL1*在花芽和花瓣中发挥的作用较大,与花芽和花瓣的生理发育关系最为密切。

5 *PsFUL1*在不同花期牡丹开花过程中的表达分析

为了探究*PsFUL1*在不同花期的牡丹品种开花过程中的作用,选取早花品种‘迎日红’、中花品

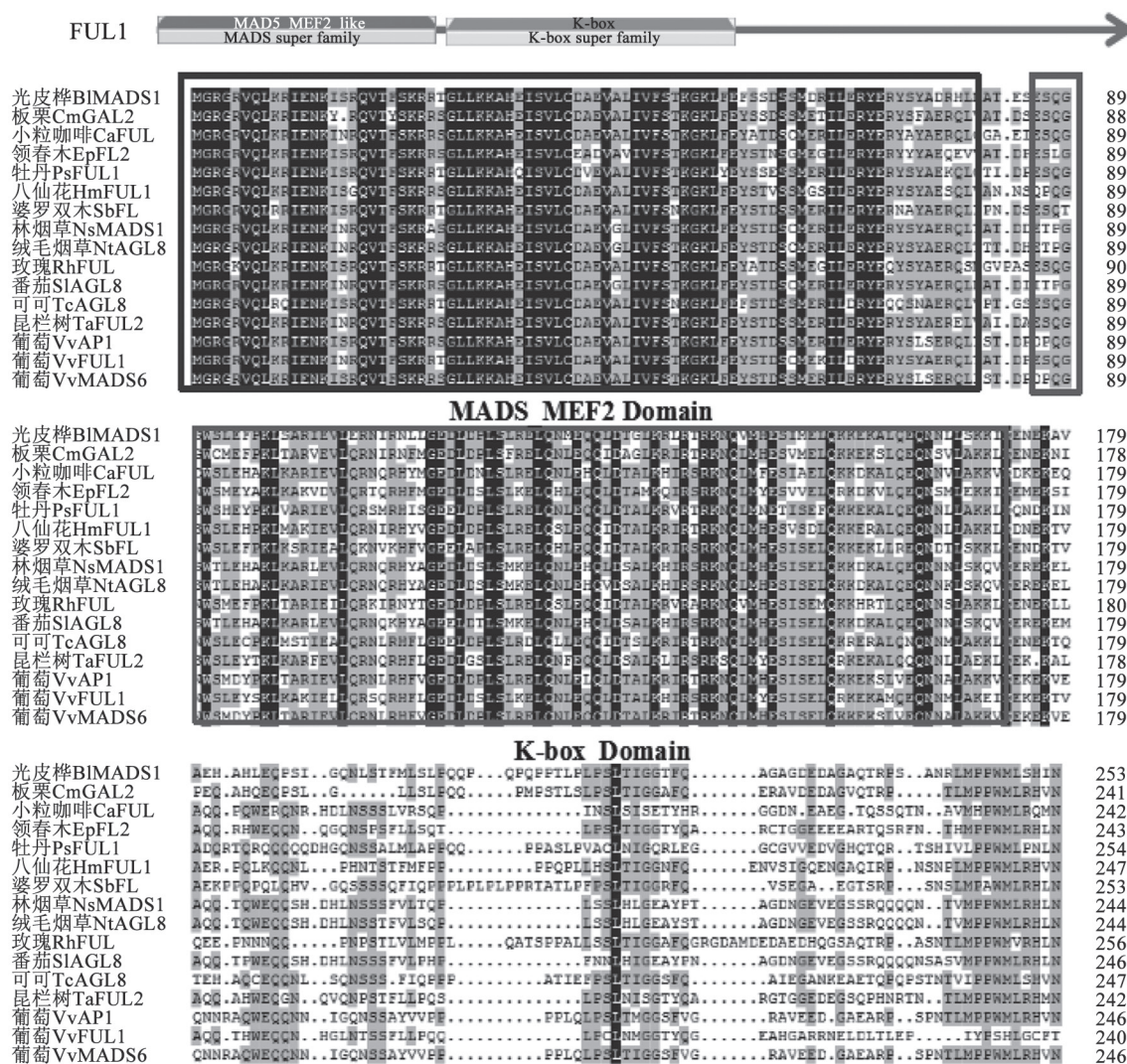


图2 *PsFUL1*氨基酸序列与其他物种同源AP1/FUL类氨基酸比较
Fig.2 Alignment of *PsFUL1* with homologous AP1/FUL proteins from other plants

种‘洛阳红’和晚花品种‘花王’的花瓣为试材进行了相关表达研究。牡丹的开花过程分为露色期(I)、绽口期(II)、初开期(III)、半开期(IV)、盛开期(V)和始衰期(VI) 6个开花时期。对于任一品种而言(‘迎日红’或‘洛阳红’或‘花王’), *PsFUL1*基因在不同开花时期中的表达量明显不同(图5)。在中花品种‘洛阳红’牡丹中, 从露色期(I)的较高水平逐渐下降至初开期(III)的最低水平, 下降了0.49倍, 然后开始增加, 在盛花期(V)达到最高, 上升了3.13倍。可以推测*PsFUL1*与牡丹花的成花转变过程和正常开放关系较为密切, 特别是对初开期到盛开期再到始衰期, 影响较为明显。

对于不同花期(早花、中花、晚花)牡丹品种

而言, *PsFUL1*基因在6个不同开花时期的表达量差异显著($P < 0.05$)。在早花品种‘迎日红’中, *PsFUL1*表达量变动不大, 但是在初开期(III)达到最高(1.56), 为露色期(I)的1.55倍, 且与后三个开花时期(IV~VI)表达量差异不显著。在晚花品种‘花王’中, *PsFUL1*表达量在露色期(I)到初开期(III)平稳增加, 在半开期(IV)骤然下降, 而后转为增加, 至始衰期(VI)达到最高(4.55)。而花期相对居中的‘洛阳红’, *PsFUL1*表达量最高时期为盛花期(V), 为4.13, 比早花品种‘迎日红’晚2个时期, 比晚花品种‘花王’提早1个时期。*PsFUL1*基因在早花品种‘迎日红’中很快达到表达高峰期, 从生物学功能上推测这可能是为了促进下游相关基因尽早启动, 以保证早花牡丹

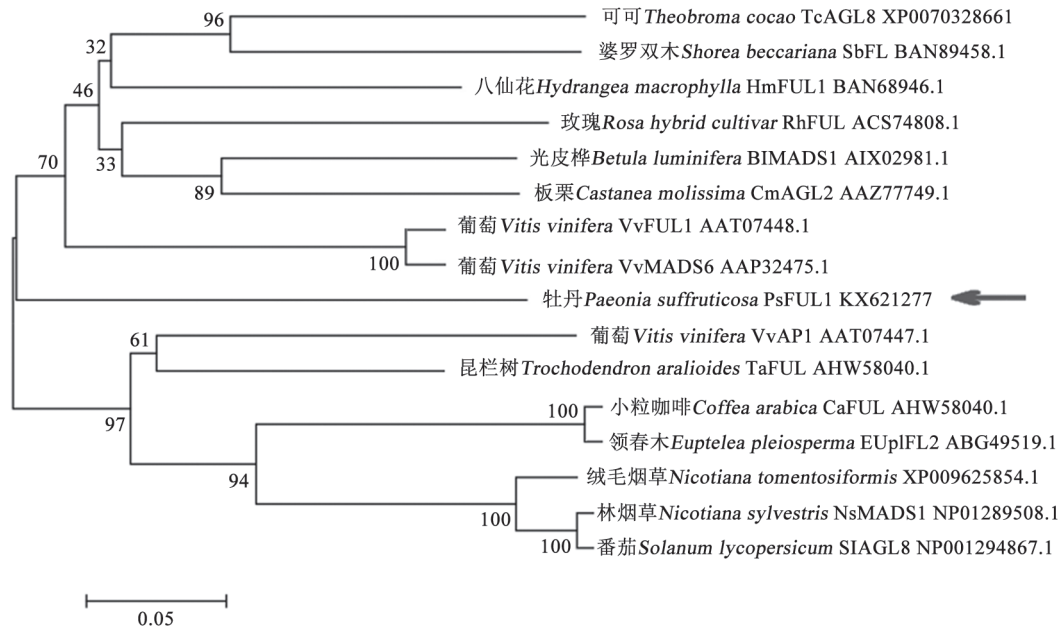


图3 PsFUL1与其他物种AP1/FUL氨基酸序列的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic relationship among PsFUL1 and amino acid sequences of AP1/FUL from different species

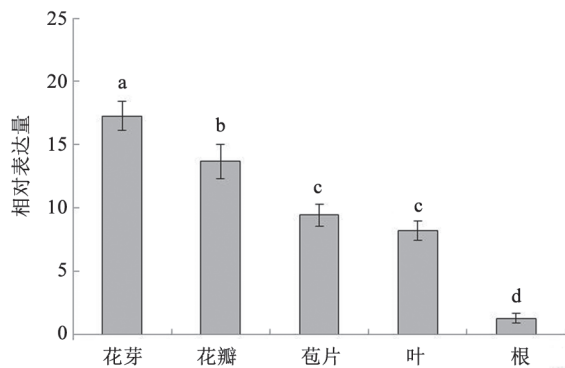


图4 *PsFUL1*在不同组织中的表达分析

Fig.4 Analysis of *PsFUL1* expression in different organs
不同小写字母表示在0.05水平上差异显著, 图5同此。

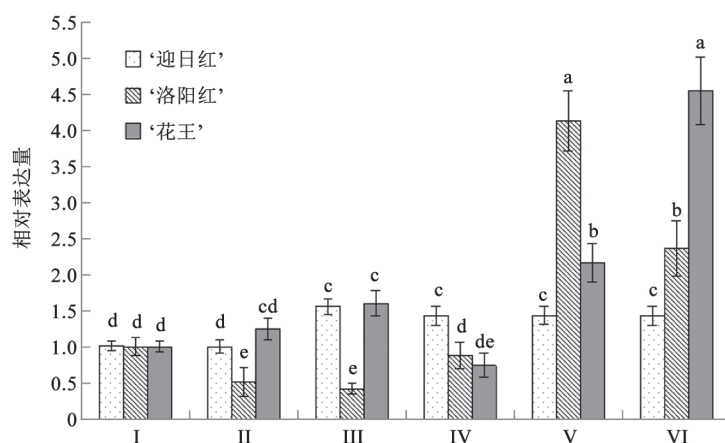
品种开花的正常进行。这些数据表明*PsFUL1*的大量表达与牡丹开花的早晚存在较为紧密的联系。

讨 论

MADS-box基因是一类非常重要的转录调控因子, 在植物生长发育和信号传导过程中起着关键性作用, 它调节着植物根、叶、花和果实的发育, 特别在花分生组织和花器官中的表达(赵兴富等2015)。目前, 在牡丹中已经克隆出与开花相关的基因有*API* (任磊等2011)、*AP2* (张启祥2011a)、

SEPALATA (张启祥2011b)、*COL4* (王顺利等2014)、*SOCI* (刘传娇等2014)、*WRKY* (石红梅等2015)和*PDH* (杨丽金等2016)等。*API/FUL*亚家族基因属于A功能基因, 既是花分生组织决定基因, 又是花器官发育基因, 在成花调控中起着至关重要的作用。

花分生组织特征基因和花器官特征基因是控制花发育的两类主要基因。*FUL*、*API*、*CAL*以及整合基因*LEAFY (LFY)*和开花抑制基因*TERMINAL FLOWER (TFL1)*与*AGAMOUS-LIKE24 (AGL24)*之间的相互作用共同决定了花分生组织的形成(Drobnyazina等2005)。在模式植物拟南芥光周期依赖性开花途径中, *FLOWER LOCUS T (FT)*基因在叶片维管束中被整合因子CONSTANS (CO)激活表达, 随后被转运至花芽顶端分生组织, 激发*FUL*与*SOCI*在顶端分生组织中表达。芽顶端分生组织转变为花序分生组织的过程中, *FUL*发挥重要作用, 并与*SOCI*在发育的花序原形成层中共同表达, 进一步诱导花序分生组织向花分生组织的转变, 从而控制开花时间(Borner等2000)。本研究首次从‘洛阳红’牡丹中克隆得到一个开花相关基因*PsFUL1*。氨基酸结构分析表明, *PsFUL1*含有典型的MADS-box、K-box结构域和ARG80多结构域, 属于MADS-

图5 *PsFUL1*在不同品种不同开花时期的表达分析Fig.5 Analysis of *PsFUL1* expression in different tree peony varieties with different flowering periods

box家族中的*API/FUL*亚家族。同源性分析表明, *PsFUL1*与葡萄、光皮桦、八仙花具有较高的同源性, 与葡萄的*FUL*类蛋白的同源性最高, 为69%。系统进化分析表明, *PsFUL1*与葡萄中的*VvFUL*聚为一枝。这与刘传娇等(2014)和王顺利等(2014)对牡丹开花调控转录因子系统进化分析的研究结果相一致。*VvFUL*是一个调控葡萄开花的重要基因, 因此推测*PsFUL1*为牡丹中的一个开花调控因子, 能够调控牡丹的开花过程。

在不同的物种中, *FUL*同源基因的表达存在一定的差异(褚婷婷等2010)。拟南芥*API/FUL*亚家族成员中, *API*、*CAL*和*FUL/AGL8*, 它们与分生组织决定、花器官发育A功能、果荚发育等有关(Borner等2000; Teper-Bamnlker和Samach 2005)。矮牵牛(*Petunia hybrida*)中已克隆的该亚家族成员*PFG*在茎、叶、苞片和花瓣中有高表达, 而幼苗、根和雄蕊中表达量很少; 外源*PFG*在超表达后, 部分转基因产生共抑制现象, 使植株保持营养生长状态, 不能向生殖生长阶段转变, 但顶部偶尔会出现开花(Immink等1999)。一粒小麦(*Triticum monococcum*)中的该亚家族成员中, *WRN2*在花器官中表达, *WRN1*和*WRN3*在营养器官中表达(Shitsukawa等2007)。番茄中该亚家族有3个成员TM4、SLMBP7和SLMBP20, 其中TM4能够和SEP-like蛋白RIN相互作用, 同时也能和SOC1-like蛋白TM3相互作用, 共同控制番茄开花时间(Leseberg等2008)。在荷花中, *NnFUL*基因在花发育初期表达

量很高, 在花器官中集中在花萼和外花瓣中表达, 这与*API/FUL*亚家族基因功能相吻合(陈岳等2015)。在本研究中, *PsFUL1*在'洛阳红'花芽和花瓣中的表达量均较高, 在苞片、叶中较低, 在根中表达量最低。这与*API/FUL*亚家族基因决定花分生组织的功能相吻合(褚婷婷等2010)。在同一品种的不同开花时期(I~VI), *PsFUL1*基因表达量有明显差异($P \leq 0.05$)。在早中晚不同花期牡丹品种的不同开花时期(I~VI)的花瓣中, *PsFUL1*基因的大量表达高峰时期也不同。在早花品种'迎日红'中, *PsFUL1*表达量在初开期(III)达到最高(1.56), 为露色期(I)的1.55倍; 对于花期相对居中的'洛阳红', *PsFUL1*表达量最高时期为盛花期(V), 为4.13; 而对于晚花品种'花王', *PsFUL1*表达量最高时期为始衰期(VI), 为4.55。*PsFUL1*基因高表达时期, 早花品种'迎日红'比中花品种'洛阳红'提前2个时期, 比晚花品种'花王'提早3个时期。*PsFUL1*基因在早花品种'迎日红'中很快达到大量表达的高峰期(III), 便于尽早启动下游相关基因的表达, 最终调控早花牡丹的正常开放。这可能解释了不同花期牡丹品种开花时间为什么早晚不同的分子生物学原因。有研究表明在拟南芥中, *FUL*和*SOC1*共同作用调控开花时间(褚婷婷等2010), 而*SOC1*在不同花期牡丹品种的花芽中表达量无显著差异(刘传娇等2014), 因此推测*PsFUL1*基因是牡丹成花转变过程以及开花调控的重要转录因子。

牡丹花期早晚的分子机理与花期调控研究是

一项重要而复杂的工作,任重道远。*PsFUL1*基因在牡丹开花以及花期调控中的功能与机理仍需进一步研究。*PsFUL1*基因仅是牡丹MADS-box基因家族中的一个成员,为了解牡丹花的形成、植株发育、营养生长过程及其之间的相互关系,在后续的研究中还需要克隆牡丹MADS-box基因家族中的其他成员,分析各自的基因功能、各成员之间是否存在协同作用或功能冗余。总之,牡丹开花相关基因*PsFUL1*的成功克隆,可为进一步揭示牡丹开花早晚的分子机理与花期调控研究奠定理论基础。

参考文献

- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, GoldS E, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J*, 24 (4): 457–466
- Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleissner R, Wisman E, Apel K, Melzer S (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*, 24 (5): 591–599
- Calonje M, Cubas P, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendrill development in grapevine. *Plant Physiol*, 135 (3): 1491–1501
- Chen Y, Zhang WW, Tian DK, Wang JG (2015). Cloning, subcellular localization and expression analysis of *NnFUL* genes from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn). *Acta Agric Shanghai*, 31 (4): 11–18 (in Chinese with English abstract) [陈岳, 张微微, 田代科, 王金刚(2015). 莲*NnFUL*基因克隆、亚细胞定位及表达分析. *上海农业学报*, 31 (4): 11–18]
- Drobnyazina PE, Khavkin EE (2005). Homologs of *APETALA1/FRUITFULL* in *Solanum* plants. *Russ J Plant Physiol*, 53 (2): 243–249
- Imminck R, Hannapel DJ, Ferrario S, Busscher M, Franken J, Lookeren Campagne MM, Angenot GC (1999). A petunia *MADS-box* gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development*, 126 (22): 5117–5126
- Jack T (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16 (1): S1–S17
- Leseberg CH, Eissler CL, Wang X, Johns MA, Duvall MR, Mao L (2008). Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *J Exp Bot*, 59 (8): 2253–2265
- Li JJ, Zhang XF, Zhao XQ (2011). *Tree Peony of China*. Beijing: Encyclopedia of China Publishing House (in Chinese) [李嘉珏, 张西方, 赵孝庆(2011). *中国牡丹*. 北京: 中国大百科全书出版社]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Liu CJ, Wang SL, Xue JQ, Zhu FY, Ren XX, Li MY, Zhang XX (2014). Molecular cloning and expression analysis of the flowering-regulating transcription factor *PrSOC1* gene in tree peony. *Acta Hort Sin*, 44 (11): 2259–2267 (in Chinese with English abstract) [刘传娇, 王顺利, 薛璟祺, 朱富勇, 任秀霞, 李名扬, 张秀新(2014). 牡丹开花调控转录因子基因*PrSOC1*的克隆与表达分析. *园艺学报*, 44 (11): 2259–2267]
- Melzer R, Verelst W, Theissen G (2009). The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in ‘floral quartet’-like complexes *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 37 (1): 144–157
- Ren L, Wang Y, Zhou L, Peng ZH (2011). Cloning and expression of *PsAPI* gene related to flowering in tree peony. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31 (9): 1719–1725 (in Chinese with English abstract) [任磊, 王雁, 周琳, 彭镇华(2011). 牡丹开花相关基因*PsAPI*的克隆与表达. *西北植物学报*, 31 (9): 1719–1725]
- Shitsukawa N, Ikari C, Shimada S, Kitagawa S, Sakamoto K, Saito H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T, Takumi S, et al (2007). The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. *Genes Genet Syst*, 82 (2): 167–170
- Saha G, Park JI, Jung HJ, Ahmed NU, Kayum MA, Chung MY, Hur Y, Cho YG, Watanabe M, Nou IS (2015). Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in *Brassica rapa*. *BMC-Genomics*, 16: 178–198
- Shi HM, Zhan XM, Guan SM, Gai SP, Liu CY, Zhang YX (2015). Cloning and expression pattern analysis of *PsWRKY* in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Physiol J*, 51 (10): 1743–1748 (in Chinese with English abstract) [石红梅, 战新梅, 管世铭, 盖树鹏, 刘春英, 张玉喜(2015). 牡丹*PsWRKY*基因的克隆和表达特性分析. *植物生理学报*, 51 (10): 1743–1748]
- Teper-Bamnlker P, Samach A (2005). The flowering integrator *FT* regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 17 (10): 2661–2675
- Wang RH, Liu YL, Li JR (2005). Studies on the blossom physiology in the different development stage of peony and chinese peony flower. *Acta Hort Sin*, 32 (5): 861–865 (in Chinese with English abstract) [王荣花, 刘雅莉, 李嘉瑞(2005). 不同发育阶段牡丹和芍药切花开花生理特性的研究. *园艺学报*, 32 (05): 861–865]
- Wang SL, Li XH, Wang K, Wang XZ, Li SS, Zhang YZ, Guo GF, Zeller FJ, Hsam SLK, Yan YM (2011). Phylogenetic analysis of C, M, N and U genomes and their relationships with triticum and other related genomes as revealed by LMW-GS genes at *Glu-3* loci. *Genome*, 54: 273–284
- Wang SL, Xue JQ, Zhu FY, Zhang P, Ren XX, Liu CJ, Zhang XX (2014). Molecular cloning, expression and evolutionary analysis of the flowering-regulating transcription factor *CON-*

- STANS-like-4* gene in tree peony. Acta Hort Sin, 41 (7): 1409–1417 (in Chinese with English abstract) [王顺利, 薛璟祺, 朱富勇, 张萍, 任秀霞, 刘传娇, 张秀新(2014). 牡丹开花调控转录因子 *CONSTANS-like-4* 基因的克隆、表达与系统进化分析. 园艺学报, 41 (7): 1409–1417]
- Wang L, Yin XJ, Cheng CX, Wang H, Guo RR, Xu XZ, Zhao J, Zheng Y, Wang XP (2015). Evolutionary and expression analysis of a *MADS-box* gene superfamily involved in ovule development of seeded and seedless grapevines. Mol Genet Genomics, 290 (3): 825–846
- Yang Y, Fanning L, Jack T (2003). The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins APETALA3 and PISTILLATA. Plant, 33 (1): 47–59
- Yang LJ, Gan T, Gai SP, Liu CY, Zhang YX (2016). Molecular cloning and expression pattern analysis of pyruvate dehydrogenase *PsPDH* gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Plant Physiol J, 52 (8): 1280–1286 (in Chinese with English abstract) [杨丽金, 甘甜, 盖树鹏, 刘春英, 张玉喜(2016). 牡丹丙酮酸脱氢酶基因*PsPDH*的克隆和表达特性分析. 植物生理学报, 52 (8): 1280–1286]
- Zhang QX (2011a). Studies on Chinese Ornamental Horticulture. Beijing: China Forestry Publishing House: 263–269 (in Chinese with English abstract) [张启翔(2011a). 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 263–269]
- Zhang QX (2011b). Studies on Chinese Ornamental Horticulture. Beijing: China Forestry Publishing House: 270–277. (in Chinese with English abstract) [张启翔(2011b). 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 270–277]
- Zhang YX, Gai SP, Liu CY, Mu P, Zheng GS (2011). Selection of control genes in real-time qPCR analysis during bud dormancy release in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Mol Plant Breeding, 9 (7): 1052–1056 (in Chinese with English abstract) [张玉喜, 盖树鹏, 刘春英, 穆平, 郑国生(2011). 牡丹花芽休眠解除过程中实时定量PCR内参基因的选择. 分子植物育种, 9 (7): 1052–1056]
- Zhao XF, Zhu YP, Xiao JY, Jia R, Jiang Z, He FM (2015). Advances of *MADS-box* genetic diversity and evolutionary development in plants. North Hort, 39 (11): 180–186 (in Chinese with English abstract) [赵兴富, 朱永平, 肖靖译, 贾荣, 江周, 和凤美(2015). 植物*MADS-box*基因多样性及进化研究进展. 北方园艺, 39 (11): 180–186]
- Zhu TT, Xie H, Xu Y, Ma RC (2010). Regulation pattern of the *FRUITFULL (FUL)* gene of *Arabidopsis thaliana*. Chin J Biotech, 26 (11): 1546–1554 (in Chinese with English abstract) [褚婷婷, 谢华, 徐勇, 马荣才(2010). 拟南芥*FRUITFULL (FUL)*基因的表达调控模式. 生物工程学报, 26 (11): 1546–1554]

Molecular cloning and expression analysis of flowering-regulating transcription factor gene *PsFUL1* in tree peony (*Paeonia suffruticosa*)

WEI Wei-Qiang^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, DUAN Ya-Bin^{1,2}, GUO Li-Li^{1,2}, ZHANG Li-Xia^{1,2}, GUO Da-Long^{2,3,*}, HOU Xiao-Gai^{1,2,*}

¹College of Agriculture/Peony, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; ²Henan Engineering Research Center for Oil Peony, Luoyang, Henan 471003, China; ³College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: One important flowering-regulating transcription factor gene *FRUITFULL* (*FUL1*) homologous gene was obtained from tree peony (*Paeonia suffruticosa* ‘Luoyanghong’) by RT-PCR method. Open reading frame (ORF) length of its cDNA was 768 bp, and could encode 255 amino acids. Sequence alignment and structure domain analysis showed that the protein possessed MADS super family, K-box super family structure domains and multi-domains in ARG80. Also, the protein had stable conservative MADS-box and K-box sequences. NCBI blast analysis found that cloned amino acid sequences had high homology at 69% compared with the *FUL*-like proteins in *Vitis vinifera*. This gene was therefore designated as *PsFUL1* and GenBank accession number was KX621277. Phylogenetic analysis showed that it had close relationship with *VvFUL1* in *V. vinifera*, belonging to subfamily *API/FUL* in MADS gene families. The results of qRT-PCR showed that *PsFUL1* gene displayed significant expression difference in different organs of *P. suffruticosa* ‘Luoyanghong’. High expression levels were observed in the bud and petal, followed by bract, leaf and root. Among the six different flowering stages of different varieties of tree peony (early-flowering ‘Yingrihong’, mid-flowering ‘Luoyanghong’, late-flowering ‘Huawang’), *PsFUL1* gene expression level had significant difference with different flowering stages and blossoms. The results indicated that *PsFUL1* gene had an important regulation effect on the flower formation and blossom in tree peony.

Key words: tree peony (*Paeonia suffruticosa*); *PsFUL1*; different flowering stages; gene expression level

Received 2016-10-27 Accepted 2017-03-02

This work was supported by Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (Grant No. 14IRT-STHN014), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370697) and Outstanding Talent Foundation (in Innovation of Science and Technology) in Henan Province (Grant No. 164200510013).

*Co-corresponding authors (E-mail: grapeguo@126.com; hxg382@126.com).