

## 白桦开花抑制因子BpFLC与BpSVP蛋白同源互作域筛选与分析

郑唐春, 臧丽娜, 代丽娟, 杨传平, 曲冠证\*

东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040

**摘要:** 开花是植物由营养生长向生殖生长的转换点, 该过程受内源基因与环境信号共同调控。FLC (*Flowering locus C*)和SVP (*Short vegetative phase*)是开花途径中关键的抑制开花因子。本文利用酵母双杂交技术深入研究白桦开花抑制因子FLC与SVP的自身聚合作用的分子机理。从重组质粒pGBKT7-*BpFLC*、pGBKT7-*BpSVP*分别克隆出6个*BpFLC*截短体[BpFLC1 (aa1~73)、BpFLC2 (aa1~173)、BpFLC3 (aa74~173)、BpFLC4 (aa60~208)、BpFLC5 (aa74~208)和BpFLC6 (aa174~208)]和6个*BpSVP*截短体[BpSVP1 (aa1~68)、BpSVP2 (aa1~172)、BpSVP3 (aa69~172)、BpSVP4 (aa60~225)、BpSVP5 (aa69~225)和BpSVP6 (aa173~225)], 分别编码MADS型蛋白的MI、MIK、K、IKC、KC和C域。在酵母Y2HGold菌中, 分别共转质粒pGBKT7-*BpFLC1*~6×pGADT7-*BpFLC*及pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP1*~6。酵母转化子Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-*BpFLC*]、Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC2*~5×pGADT7-*BpFLC*], 可在选择性固体培养基TDO (SD/-Leu/-Trp/-His)、QTO/A (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA)上生长, 并在QDO/A/X (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA/X- $\alpha$ -gal)上长出蓝色菌落, 表明BpFLC能与自身及截短体蛋白BpFLC2~5同源结合。此外酵母Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP*]、Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP2*~5]也能同时激活报告基因*AUR1-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 说明BpSVP能与自身及截短体蛋白BpSVP2~5同源结合。对保守区的序列结构进一步分析发现: BpFLC与BpSVP的K域是它们能够同源结合, 介导BpFLC与BpSVP自身形成同源二聚体的关键。

**关键词:** 白桦; *BpFLC*; *BpSVP*; 酵母双杂交; 截短体; 蛋白互作

## Identification and Analysis of Acting Domains Mediating the Protein Self-Interactions Between BpFLC and BpSVP from *Betula platyphylla*

ZHENG Tang-Chun, ZANG Li-Na, DAI Li-Juan, YANG Chuan-Ping, QU Guan-Zheng\*

State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Flowering, transition from vegetative to reproductive phase in plants, is regulated by both endogenous and environmental signals. *Flowering locus C* (FLC) and *short vegetative phase* (SVP) are the key genes in delaying flowering. For further study on the mechanism of interaction between SVP and FLC in birch, the test was performed by yeast two-hybrid. The truncated genes of *BpFLC* [BpFLC1 (aa1~73), BpFLC2 (aa1~173), BpFLC3 (aa74~173), BpFLC4 (aa60~208), BpFLC5 (aa74~208) and BpFLC6 (aa174~208)] and *BpSVP* [BpSVP1 (aa1~68), BpSVP2 (aa1~172), BpSVP3 (aa69~172), BpSVP4 (aa60~225), BpSVP5 (aa69~225) and BpSVP6 (aa173~225)] were respectively cloned from yeast recombination plasmids pGBKT7-*BpFLC* and pGBKT7-*BpSVP*, the truncated forms respectively encoded the MI, MIK, K, IKC, KC and C domain of MADS protein. pGBKT7-*BpFLC1*~6×pGADT7-*BpFLC* and pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP1*~6 were co-transferred into yeast Y2HGold. The yeast strains of Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-*BpFLC*] and Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC2*~5×pGADT7-*BpFLC*] could grow on selective agar plates TDO (SD/-Leu/-Trp/-His), QTO/A (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA), or QDO/X/A (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA/X- $\alpha$ -gal) with blue stains. The results showed that BpFLC and truncated forms BpFLC2~5 protein or self-BpFLC could act with each other to form homodimers. Then Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP*] and Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP2*~5] were also brought into proximity to form protein compounds and activate transcription of four independent reporter genes, such as *AUR1-C*, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*. The results also showed that BpSVP and truncated forms BpSVP2~5 protein or self-BpSVP could act with each other to form

收稿 2015-03-04 修定 2015-08-18

资助 国家高技术研究发展计划(2011AA100202-1-6)和“十二五”农村领域国家科技计划(2013AA102704)。

\* 通讯作者(E-mail: quguanzheng@yahoo.com; Tel: 0451-82192695)。

homodimers. Further study of sequence structure of conserved domain, the results strongly showed that the K domain of BpFLC and K domain of BpSVP were the key structure domains and mediated the protein interactions between BpFLC and BpSVP protein homologous dimerization.

**Key words:** *Betula platyphylla*; *BpFLC*; *BpSVP*; yeast two-hybrid; truncated form; protein interaction

植物的开花是一个高度复杂的生理过程, 不仅受环境条件诱导、信号传导, 还受开花决定基因控制。根据前期的大量研究, 拟南芥中已知有多种遗传途径参与成花转变, 例如光周期途径、春化途径、自主途径及赤霉素途径等(Blázquez和Weigel 2000; Mouradov等2002; Simpson和Dean 2002; Boss等2004)。FLOWERING LOCUS C (FLC)和SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)是开花信号整合子的两个核心调节蛋白, 它们通过相互作用一起调节其他开花信号整合因子。在春化途径中, FLC起到关键的作用(Michaels和Amasino 1999; Sheldon等2002)。SVP参与自主途径、温敏途径和赤霉素途径的调控(Hartmann等2000; Michaels和Amasino 2000; Liu等2007)。FLC和SVP形成复合体共同结合于开花途径整合因子FLOWERING LOCUS T (FT)和SUPPRESSOR OF OVER-EXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)的启动区域, 降低FT及SOC1的转录水平, 延迟植物开花(Lee等2007; Li等2008; Giakountis和Coupland 2008)。此外FLC和SVP蛋白还能影响开花协调因子FLOWERING LOCUS D (FD)的表达, 削弱分生组织对开花信号的响应(Abe等2005)。

早期的研究已经表明, MADS-box转录因子之间存在相互作用, 并且通过酵母双杂交实验证实了拟南芥中的多个MADS蛋白不仅能够形成异源二聚体, 而且还能形成同源二聚体, 最终结合为同源异源四聚体(Immink等2002; Yang和Jack 2004; de Folter等2005; Nougalli等2006)。近期, 汤青林等(2011, 2012, 2013)利用pET原核表达系统和酵母双杂交系统也已经在十字花科的芥菜中证实了BjFLC和BjSVP存在互作, 且能够形成同源二聚体及异源二聚体。

白桦又称桦木, 是我国东北地区的主要树种。具有耐贫瘠、耐严寒、生长快等特性(卞丽萍等2001; 詹亚光和杨传平2002; 李天芳等2008; 占爱瑶等2010)。为了延长白桦的营养生长时间, 获得高质量的白桦材料, 探究白桦的晚花机制至关

重要。本实验的前期结果已经表明白桦BpFLC和BpSVP确实存在相互作用(郑唐春等2015)。但是在林木中探究两个MIKC型蛋白如何相互作用, 哪个保守域起关键作用, 与草本植物比较是否存在异同, 目前仍不清楚。本研究中分别构建了白桦*BpFLC*基因和*BpSVP*基因的6个截短体, 利用酵母双杂交技术平台筛选和鉴定白桦BpFLC和BpSVP蛋白互作的结构域, 为深入分析白桦BpFLC与BpSVP间的结合区域和调节位点等提供理论和技术基础。

## 材料与方法

### 1 实验材料

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)的酵母表达载体pGBKT7-*BpFLC*、pGADT7-*BpFLC*、pGBKT7-*BpSVP*、pGADT7-*BpSVP*载体由前期构建; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 感受态菌株购自天根生化科技有限公司(北京); 酵母双杂交表达载体pGBKT7-BD、pGADT7-AD, 对照质粒pGBKT7-53、pGBKT7-*Lam*、pGADT7-*T*, 酵母菌Y2HGold, 酵母省缺培养基及转化试剂均购自Clontech公司(日本); 质粒提取、胶回收试剂盒购自OMEGA公司(美国); PCR相关试剂、DNA marker、限制性内切酶*EcoRI*、*NdeI*, T<sub>4</sub> DNA ligase连接酶购自TaKaRa公司(日本); 胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、YNB (无氨基酸酵母氮源)购自Amresco公司(美国); 所用引物合成、测序服务由博仕生物技术有限公司(哈尔滨)完成; 其他实验试剂均为进口或国产分析纯。

### 2 酵母诱饵载体的构建及转化

#### 2.1 目的基因的克隆

根据本实验室前期结果, 以pGADT7-*BpFLC*质粒为模版, 参照表1中的引物, 利用*ExTaq* DNA高保真聚合酶扩增*BpFLC*截短体BpFLC1 (aa1~73)、BpFLC2 (aa1~173)、BpFLC3 (aa74~173)、BpFLC4 (aa60~208)、BpFLC5 (aa74~208)和BpFLC6 (aa174~208); 以pGBKT7-*BpSVP*质粒为模版, 利用

*ExTaq* DNA高保真聚合酶扩增*BpSVP*截短体BpSVP1 (aa1~68)、BpSVP2 (aa1~172)、BpSVP3 (aa69~172)、BpSVP4 (aa60~225)、BpSVP5 (aa69~225)和BpSVP6 (aa173~225)。PCR反应体系: 10×Ex PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , Primer-F (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Primer-R (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , *ExTaq* DNA聚合酶(5  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 模板1  $\mu\text{L}$  (约10 ng), 加ddH<sub>2</sub>O至终体积25  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min。反应结束后取3  $\mu\text{L}$ 反应产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析。

## 2.2 酵母表达载体的构建

将PCR产物利用胶回收试剂盒回收后, 用*Nde*I和*Eco*RI限制性内切酶分别酶切目的片段(*BpFLC1~6*及*BpSVP1~6*)和载体(pGBKT7-BD和pGADT7-AD), 酶切体系: *Nde*I 1  $\mu\text{L}$ , *Eco*RI 1  $\mu\text{L}$ , 10×H buffer 2  $\mu\text{L}$ , 质粒1  $\mu\text{g}$ , 加ddH<sub>2</sub>O至终体积20  $\mu\text{L}$ 。在37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中恒温处理2.5 h。用DNA纯化试剂盒回收目的片段。然后进行目的片段的连接重组, 连接体系: 10×T<sub>4</sub> DNA ligase buffer 1  $\mu\text{L}$ , T<sub>4</sub> DNA ligase 1  $\mu\text{L}$ , 目的片段与载体摩尔比10:1, 加ddH<sub>2</sub>O至终体积10  $\mu\text{L}$ 。16  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 分别涂布含有卡那霉素(50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan)或氨苄霉素(50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Amp)的LB平板培养, 37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养14~16 h。然后挑取单克隆进行菌液PCR, 提质粒进行质粒PCR和酶切鉴定, 最后将阳性克隆送往博仕生物技术有限公司测序鉴定。

## 2.3 酵母Y2HGold感受态制备及转化

参考Clontech公司Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System操作手册及本实验室的改良法(郑唐春等2011), 采用PEG/LiAc法依次将重组质粒pGBKT7-*BpFLC*/pGADT7-*BpFLC*、pGBKT7-*BpSVP*/pGADT7-*BpSVP*、pGBKT7-*BpFLC1~6*/pGADT7-*BpFLC*、pGBKT7-*BpSVP1~6*/pGADT7-*BpSVP1~6*分别共转入Y2HGold感受态细胞, 平行设置空白载体对照实验。为了书写简便, 酵母菌株Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-*BpFLC*], 简写为FF。Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC1~6*×pGADT7-*BpFLC*], 分别简写为F1F、F2F、F3F、F4F、F5F和F6F。酵母试剂盒中自带的阳性对照和阴性对照分别简写为PC和

NC。空载对照Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC1~6*×pGADT7-AD]简写为F1A、F2A、F3A、F4A、F5A和F6A; Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-*BpFLC*]简写为BS; Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-AD]简写为FA。同样, Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP*]简写为SS。Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP1~6*]分别简写为SS1、SS2、SS3、SS4、SS5和SS6。空载对照菌株Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-*BpSVP1~6*]简写为BS1、BS2、BS3、BS4、BS5和BS6; Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-*BpSVP*]简写为BS; Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-AD]简写为SA。转化完成后, 分别涂布SD/-Leu/-Trp (DDO)二缺培养基。30  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养3~4 d, 观察转化情况。

## 3 结构域筛选与鉴定

SD/-Leu/-Trp二缺培养基上随机挑取直径大于2 mm的单克隆, 用50  $\mu\text{L}$ 无菌水重悬后, 进行菌液PCR检验后。分别取2  $\mu\text{L}$ 分别转移至SD/-Leu/-Trp (DDO, 色氨酸/亮氨酸省缺培养基)、SD/-Leu/-Trp/-His (TDO, 色氨酸/亮氨酸/组氨酸省缺培养基)、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA (QDO/A, 色氨酸/亮氨酸/组氨酸/腺嘌呤省缺培养基并添加AbA)和SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/AbA/X- $\alpha$ -gal (QDO/A/X, 色氨酸/亮氨酸/组氨酸/腺嘌呤省缺培养基并添加AbA和X- $\alpha$ -gal)培养基平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$ 培养3~5 d后, 观察平板的生长情况及菌落颜色变化。

## 4 同源性比对及 $\alpha$ 螺旋预测

使用NCBI的Blastp下的PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)进行同源性分析, 在结果中筛选同源性较高的如下序列: TcFLC (可可树*Theobroma cacao*, XP\_007043954); DIFLC (龙眼*Dimocarpus longan*, AHZ89709); VvFLC (葡萄*Vitis vinifera*, NP\_001268057); EgFLC (桉树*Eucalyptus grandis*, XP\_010025294); PeFLC (胡杨*Populus euphratica*, XP\_011020779); SIFLC (番茄*Solanum lycopersicum*, XP\_004239235); CtFLC (枳*Citrus trifoliata*, ACB72864); StFLC (马铃薯*Solanum tuberosum*, XP\_006352169); CaFLC (咖啡树*Coffea arabica*, ADU56823); NsFLC (烟草*Nicotiana sylvestris*, XP\_009795052); SbFLC (娑罗*Shorea*

表1 本文所用的引物序列

Table 1 All the primers used in this study

引物名称	碱基序列(5'→3')	用途	
<i>BpFLC-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGGGCGCAAGAAAGTGCTGCTG	<i>BpFLC</i> 基因全长及截短体克隆	
<i>BpFLC-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTATGGAAGCAAACCTAAGTGTTCCTG		
<i>BpFLC1-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGGGCGCAAGAAAGTG		
<i>BpFLC1-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCGCGACTCCGATGATGCTCAAG		
<i>BpFLC2-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGGGCGCAAGAAAGTG		
<i>BpFLC2-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCGATGCAATCTCCCTCTCTAATAG		
<i>BpFLC3-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GTTGAAAGGAGAAATGAAGGCAT		
<i>BpFLC3-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCGATGCAATCTCCCTCTCTAATAG		
<i>BpFLC4-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGGCAACAGCTTGGGCAAGATCC		
<i>BpFLC4-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTATGGAAGCAAACCTAAGTG		
<i>BpFLC5-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GTTGAAAGGAGAAATGAAGGCAT		
<i>BpFLC5-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTATGGAAGCAAACCTAAGTG		
<i>BpFLC6-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GATGAAGAATAGTGAAGGCAGA	<i>BpSVP</i> 基因全长及截短体克隆	
<i>BpFLC6-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTATGGAAGCAAACCTAAGTG		
<i>BpSVP-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGCGAGGGAGAAGATCAAGATC		
<i>BpSVP-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTTAAAGTGATAGCCCTAATTTGAGAG		
<i>BpSVP1-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGCGAGGGAGAAGATC		
<i>BpSVP1-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTTTCAAGTATATCCTTCATAC		
<i>BpSVP2-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GGCGAGGGAGAAGATC		
<i>BpSVP2-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTCCATCATCTTCTGTTTAAATTG		
<i>BpSVP3-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GATAATCTTCAGTCTAATAGC		
<i>BpSVP3-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTCCATCATCTTCTGTTTAAATTG		
<i>BpSVP4-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GTCAGTATGAAGGATATACTTG		
<i>BpSVP4-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTTAAAGTGATAGCCCTAATTTGAG		
<i>BpSVP5-NdeI-F</i>	ATCCATATG TATAATCTTCAGTCTAATAGC	pGADT7-AD载体通用引物	
<i>BpSVP5-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTTAAAGTGATAGCCCTAATTTGAG		
<i>BpSVP6-NdeI-F</i>	ATCC <u>ATAT</u> GTCGTATAAGGGGAAAAGAC		
<i>BpSVP6-EcoRI-R</i>	ATCGAATTCCTTAAAGTGATAGCCCTAATTTGAG		
AD-F	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC		pGBKT7-BD载体通用引物
AD-R	GTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT		
BD-F	TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGG	pGBKT7-BD载体通用引物	
BD-R	CCTAAGAGTCACTTTAAATTTGTATACAC		

下划线为*NdeI*或*EcoRI*酶切位点。

*beccariana*, BAN89459); AtFLC (拟南芥*Arabidopsis thaliana*, AAD21248); OsFLC (水稻*Oryza sativa*, ACY26071); CcSVP (山核桃*Carya cathayensis*, AIA58526); PeSVP (胡杨*Populus euphratica*, XP\_011016930); TcSVP (可可树*Theobroma cacao*, XP\_007018219); EgSVP (桉树*Eucalyptus grandis*, XP\_010060099); SbSVP (娑罗*Shorea beccariana*, BAN89455); VvSVP (葡萄*Vitis vinifera*, XP\_002285687); CsSVP (柑橘*Citrus sinensis*, XP\_006472470); GhSVP (陆地棉*Gossypium hirsutum*, AGW23339); NnSVP (荷花*Nelumbo nucifera*, XP\_010254525); CaSVP (咖啡树*Coffea arabica*,

ADU56833); JcSVP (麻风树*Jatropha curcas*, KDP41475); AdSVP (猕猴桃*Actinidia deliciosa*, AFA37965); IbSVP (甘薯*Ipomoea batatas*, AAK27151); AtSVP (拟南芥*Arabidopsis thaliana*, ABU95408); OsSVP (水稻*Oryza sativa*, ABF94360), 利用BioEdit软件进行序列比对。同时对K域利用在线Coils ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html))预测 $\alpha$ 螺旋的位置。

## 实验结果

### 1 *BpFLC*截短体的克隆及其酵母载体构建

从酵母质粒pGBKT7-*BpFLC*中克隆了*Bp-*



*FLC1* (aa1~73)、*BpFLC2* (aa1~173)、*BpFLC3* (aa74~173)、*BpFLC4* (aa60~208)、*BpFLC5* (aa74~208)和*BpFLC6* (aa174~208)共6个*BpFLC*截短体, *BpFLC*基因全长627 bp, 编码208个氨基酸。截短体大小分别为219、519、300、450、408和108 bp, 分别编码73、173、100、149、135和35个氨基酸, 分别对应BpFLC全长MIKC型蛋白的MI域、MIK域、K域、IKC域、KC域和C域(图

1-A)。截短体*BpFLC1*~6分别与酵母质粒pGBKT7-BD重组, 获得诱饵质粒pGBKT7-*BpFLC1*~6。PCR检测(图2-A)、*NdeI/EcoRI*双酶切鉴定(图3-A)以及测序结果表明酵母诱饵质粒完全正确。

**2 BpSVP 截短体的克隆及其酵母载体构建**

从酵母质粒pGBKT7-*BpSVP*中克隆了*BpSVP1* (aa1~68)、*BpSVP2* (aa1~172)、*BpSVP3* (aa69~172)、*BpSVP4* (aa60~225)、*BpSVP5* (aa69~225)和

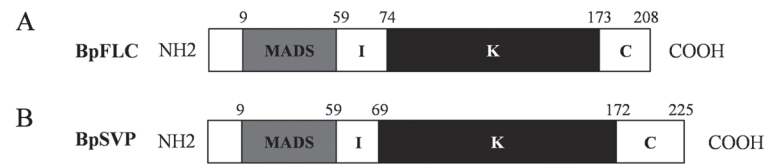


图1 白桦BpFLC (A)及BpSVP (B)蛋白结构域的组成

Fig.1 Domain structure of BpFLC (A) and BpSVP (B) in *B. platyphylla*  
MADS: MADS结构域; I: I结构域; K: K结构域; C: C末端; NH2: 氨基端; COOH: 羧基端。

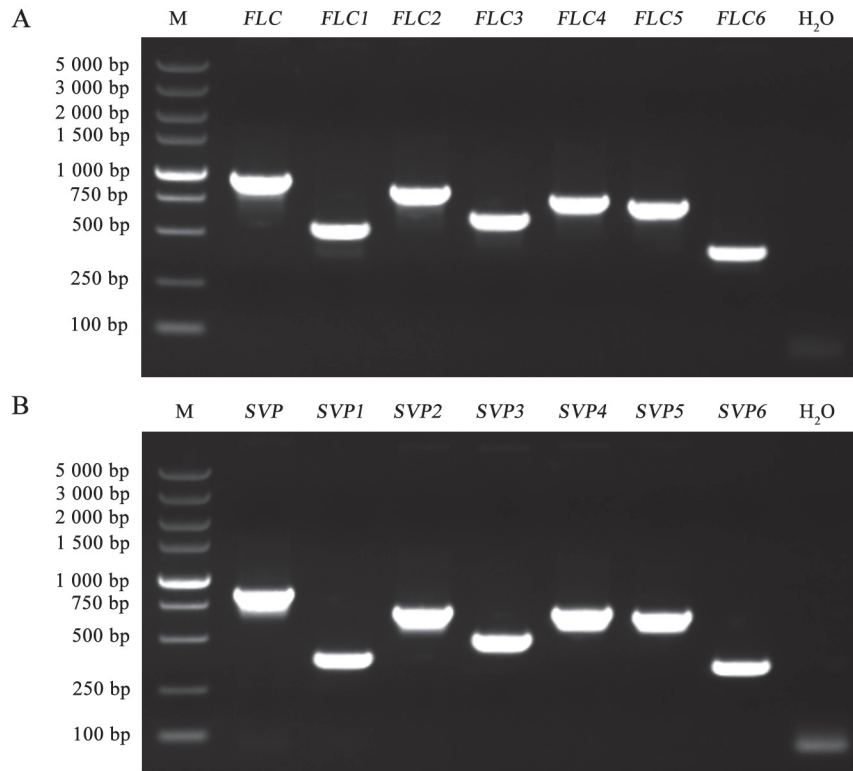


图2 酵母表达质粒的PCR产物电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of PCR products of yeast expression plasmids

A: BD通用引物对pGBKT7-*BpFLC1*~6重组载体的PCR检测; M: DNA marker DL5000; *FLC*: BD通用引物对pGBKT7-*BpFLC*重组载体的PCR检测; *FLC1*~6: BD通用引物对pGBKT7-*BpFLC1*~6重组载体PCR检测; H<sub>2</sub>O: 水对照。B: AD通用引物对pGADT7-*BpSVP1*~6重组载体的PCR检测; M: DNA marker DL5000; *SVP*: AD通用引物对pGADT7-*BpSVP*重组载体PCR检测; *SVP1*~6: AD通用引物对pGADT7-*BpSVP1*~6重组载体PCR检测; H<sub>2</sub>O: 水对照。

*BpSVP6* (aa173~225)共6个*BpSVP*截短体, *BpSVP*基因全长678 bp, 编码225个氨基酸。截短体大小分别为204、516、312、501、474和162 bp, 分别编码68、172、104、166、157和53个氨基酸, 分别对应*BpSVP*全长MIKC型蛋白的MI域、MIK域、K域、IKC域、KC域和C域(图1-B)。截短体*BpSVP1~6*分别与酵母质粒pGADT7-AD重组, 获得重组质粒pGADT7-*BpSVP1~6*。PCR检测(图2-B)、*NdeI/EcoRI*双酶切鉴定(图3-B)以及测序结果表明酵母重组质粒完全正确。

### 3 BpFLC蛋白自身互作的鉴定及与截短体互作的筛选

酵母双杂交结果(表2)表明: Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-*BpFLC*]能够在TDO、QDO/A固体培养基上生长, 且在QDO/A/X平板上变为蓝色(图4-A), 长势和阳性对照PC类似。说明*BpFLC*蛋白能自身形成同源二聚体复合物, 激活下游的4个报告基因*AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*。同时其截短体*BpFLC2* (aa1~173)、*BpFLC3* (aa74~173)、*BpFLC4* (aa60~208)、*BpFLC5* (aa74~208)也分别能与*BpFLC*蛋白结合, 均能在TDO、QDO/A、QDO/A/X固体培养基上生长(图4-A), 说明激活了酵母的4个报告基因*AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*的表达。而其他的F1F、F6F、空载体对照及阴性对照虽然都能够在DDO双缺培养基上生长, 证明两种载体已经转入酵母。

但它们并不能在TDO、QDO/A、QDO/A/X固体培养基上生长, 说明它们在体内不能形成蛋白复合物, 无法激活下游的报告基因。

### 4 BpSVP蛋白自身互作的鉴定及与截短体互作的筛选

酵母双杂交结果(表2)表明: Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP*]能够在TDO、QDO/A、QDO/A/X固体培养基上生长, 且为蓝色(图4-B), 长势和阳性对照PC类似。说明*BpSVP*蛋白自身也能形成同源二聚体复合物, 将下游的4个报告基因*AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*激活。同时其截短体*BpSVP2* (aa1~172)、*BpSVP3* (aa69~172)、*BpSVP4* (aa60~225)、*BpSVP5* (aa69~225)也分别能与*BpSVP*蛋白结合, 均能在TDO、QDO/A、QDO/A/X固体培养基上生长(图4-B), 说明也激活了酵母的4个报告基因*AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*的表达。其他的SS1、SS6、空载体对照及阴性对照虽然都能够在DDO双缺培养基上生长, 说明两种载体已经转入酵母。但它们并不能在TDO、QDO/A、QDO/A/X固体培养基上生长, 说明它们在体内不能形成蛋白复合物, 无法激活下游的报告基因。

### 5 BpFLC与BpSVP的K域氨基酸序列分析

通过对K域氨基酸序列同源性比对分析, 结果显示: 白桦*BpSVP*和*BpFLC*与其他物种K域保守性较高, 且*SVP*的K域保守性高于*FLC*。与其他的

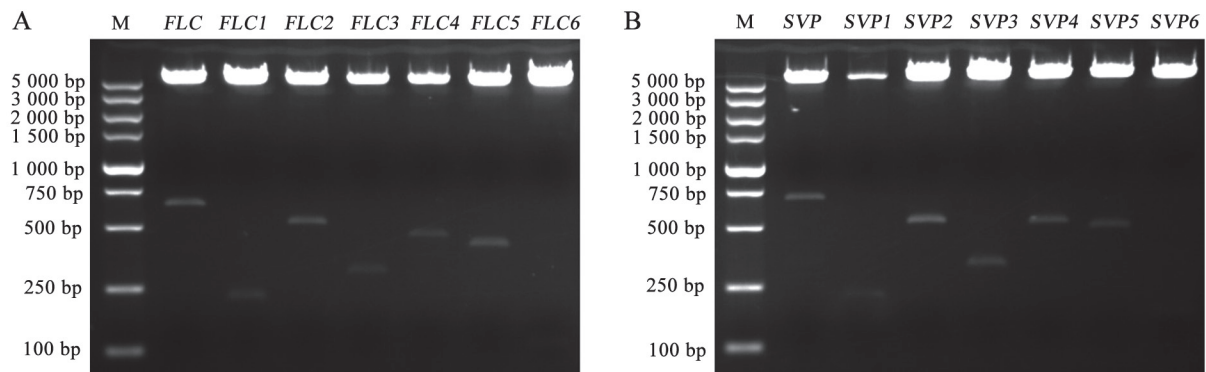


图3 酵母重组质粒的双酶切鉴定

Fig.3 Electrophoretogram of yeast recombinant plasmids digested by restriction enzymes

A: *NdeI*和*EcoRI*对pGBKT7-*BpFLC1~6*重组载体的酶切检测; M: DNA marker DL5000; *FLC*: *NdeI*和*EcoRI*对pGBKT7-*BpFLC*重组载体酶切检测; *FLC1~6*: *NdeI*和*EcoRI*对pGBKT7-*BpFLC1~6*重组载体酶切检测。B: *NdeI*和*EcoRI*对pGADT7-*BpSVP1~6*重组载体的酶切检测; M: DNA marker DL5000; *SVP*: *NdeI*和*EcoRI*对pGADT7-*BpSVP*重组载体酶切检测; *SVP1~6*: *NdeI*和*EcoRI*对pGADT7-*BpSVP1~6*重组载体酶切检测。

表2 酵母中BpFLC与BpSVP自身同源相互作用分析

Table 2 Analysis of the self-interactions between BpFLC and BpSVP in yeast

编号	类型	DDO	TDO	QDO/A	QDO/A/X	MEL1	AURI-C
PC	Y2HGold [pGBKT7-53×pGADT7-T]	+	+	+	++	蓝色	有
NC	Y2HGold [pGBKT7-Lam×pGADT7-T]	+	-	-	-	无	无
FA	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
BF	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpFLC]	+	-	-	-	无	无
FF	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC×pGADT7-BpFLC]	+	+	+	++	蓝色	有
F1A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC1×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F2A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC2×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F3A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC3×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F4A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC4×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F5A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC5×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F6A	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC6×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
F1F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC1×pGADT7-BpFLC]	+	-	-	-	无	无
F2F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC2×pGADT7-BpFLC]	+	+	+	++	蓝色	有
F3F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC3×pGADT7-BpFLC]	+	+	+	++	蓝色	有
F4F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC4×pGADT7-BpFLC]	+	+	+	++	蓝色	有
F5F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC5×pGADT7-BpFLC]	+	+	+	++	蓝色	有
F6F	Y2HGold [pGBKT7-BpFLC6×pGADT7-BpFLC]	+	-	-	-	无	无
SA	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-AD]	+	-	-	-	无	无
BS	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP]	+	-	-	-	无	无
SS	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP]	+	+	+	++	蓝色	有
BS1	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP1]	+	-	-	-	无	无
BS2	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP2]	+	-	-	-	无	无
BS3	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP3]	+	-	-	-	无	无
BS4	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP4]	+	-	-	-	无	无
BS5	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP5]	+	-	-	-	无	无
BS6	Y2HGold [pGBKT7-BD×pGADT7-BpSVP6]	+	-	-	-	无	无
SS1	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP1]	+	-	-	-	无	无
SS2	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP2]	+	+	+	++	蓝色	有
SS3	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP3]	+	+	+	++	蓝色	有
SS4	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP4]	+	+	+	++	蓝色	有
SS5	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP5]	+	+	+	++	蓝色	有
SS6	Y2HGold [pGBKT7-BpSVP×pGADT7-BpSVP6]	+	-	-	-	无	无

++, +和-分别表示蓝色菌落、白色菌落和无菌落。

MADS家族成员的K域一样, BpFLC与BpSVP的K域也由K1、K2和K3三个亚域组成, 每个亚域均包括七价的(abcdefg)<sub>n</sub>重复区(图5)。由于a和d位置几乎全为疏水氨基酸, 故而K域至少会形成3个经典的 $\alpha$ 螺旋, 这与在线Coils ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html))预测的结果一致。

白桦BpFLC蛋白的K域含有4个 $\alpha$ 螺旋。第1个 $\alpha$ 螺旋(K1亚域)位于I域(I域部分未列出)和K域(aa1~13)之间; 第2个 $\alpha$ 螺旋(K1亚域)位于K域(aa31~36)的中前部; 第3个 $\alpha$ 螺旋(K2亚域)位于K域(aa54~69)的中间; 第4个 $\alpha$ 螺旋(K3亚域)位于K域(aa91~100)和C域(C域部分未列出)之间。白桦

BpSVP蛋白的K域含有3个经典的 $\alpha$ 螺旋。第1个 $\alpha$ 螺旋(K1亚域)位于K域(aa23~51)前面部分; 第2个 $\alpha$ 螺旋(K2亚域)位于K域(aa59~74)的中部; 第3个 $\alpha$ 螺旋(K3亚域)位于K域(aa91~104)和C域(C域部分未列出)之间。在BpFLC蛋白的K2亚域与K3亚域、BpSVP蛋白的K2与K3亚域之间和BpSVP蛋白的K3亚域间含有有一个或两个高度保守的碱性赖氨酸Lys (K), 它并未影响 $\alpha$ 螺旋结构(图5, 红色虚线框)。BpFLC蛋白的K域中含有5个高度保守的氨基酸位点(图5, 红框实线框), 除了1个位点为酸性谷氨酸Glu (E), 其他4个均为疏水亮氨酸Leu (L)。BpSVP蛋白的K域保守性更高, 在3个亚域中含有9



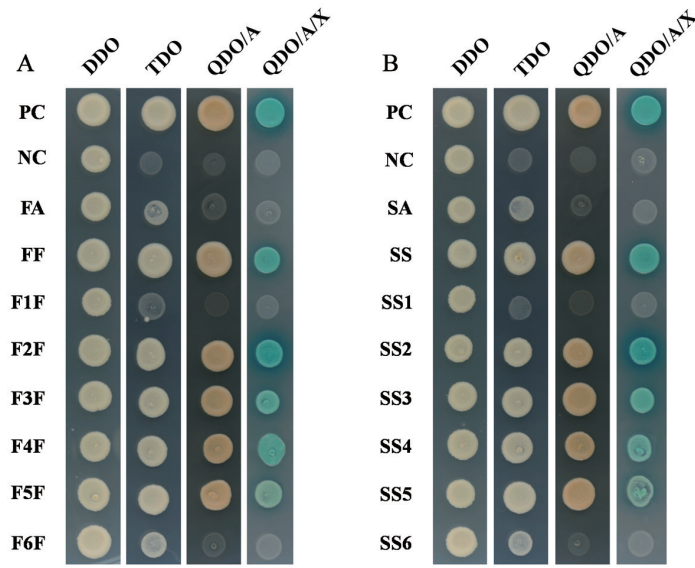


图4 酵母中BpFLC/BpSVP与截短体之间相互作用验证

Fig.4 Verification of interactions between BpFLC/BpSVP and its truncated forms in yeast

A: 酵母中BpFLC与截短体之间相互作用验证; B: 酵母中BpSVP与截短体之间相互作用验证。PC: 阳性对照; NC: 阴性对照; FA: pGBKT7-*BpFLC*与pGADT7-AD双载体共转Y2HGOLD; FF: pGBKT7-*BpFLC*与pGADT7-*BpFLC*双载体共转Y2HGOLD; F1F~F6F: pGBKT7-*BpFLC1-6*与pGADT7-*BpFLC*双载体共转Y2HGOLD; SA: pGBKT7-*BpSVP*与pGADT7-AD双载体共转Y2HGOLD; SS: pGBKT7-*BpSVP*与pGADT7-*BpSVP*双载体共转Y2HGOLD; SS1~SS6: pGBKT7-*BpSVP*与pGADT7-*BpSVP1-6*双载体共转Y2HGOLD。

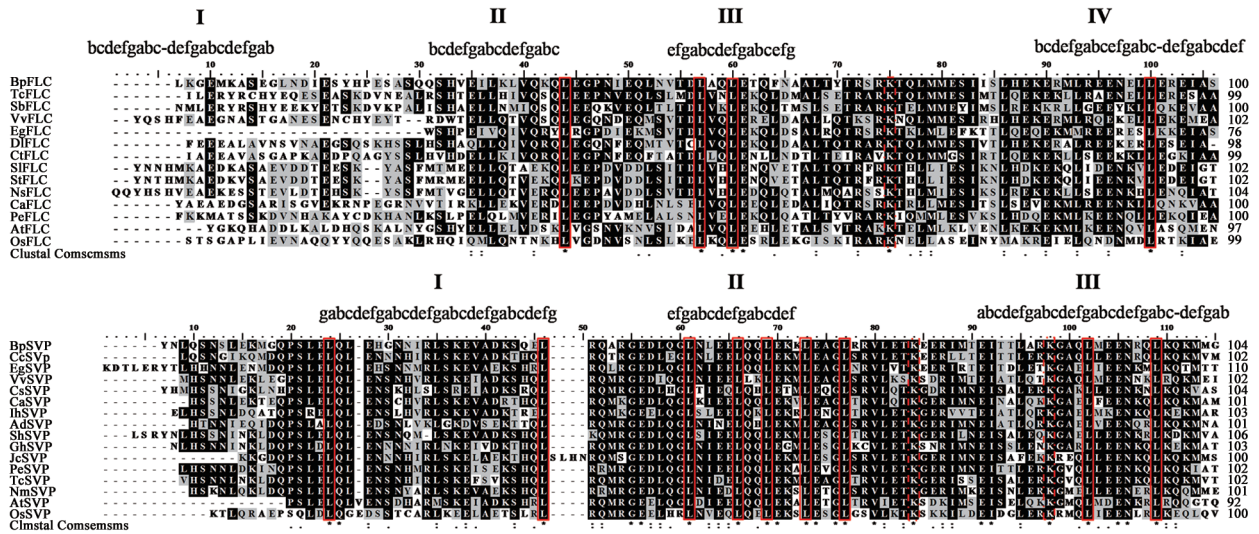


图5 FLC与SVP的K域序列同源性比对

Fig.5 Sequence alignment of K domain from FLC and SVP

BpFLC: 白桦FLC; TcFLC: 可可树FLC; DfFLC: 龙眼FLC; VvFLC: 葡萄FLC; EgFLC: 桉树FLC; PeFLC: 胡杨FLC; SifLC: 番茄FLC; CtFLC: 枳FLC; StFLC: 马铃薯FLC; CaFLC: 咖啡树FLC; NsFLC: 烟草FLC; SbFLC: 娑罗FLC; AtFLC: 拟南芥FLC; OsFLC: 水稻FLC; BpSVP: 白桦SVP; CcSVP: 山核桃SVP; PeSVP: 胡杨SVP; TcSVP: 可可树SVP; EgSVP: 桉树SVP; SbSVP: 娑罗SVP; VvSVP: 葡萄SVP; CsSVP: 柑橘SVP; GhSVP: 陆地棉SVP; NnSVP: 荷花SVP; CaSVP: 咖啡树SVP; JcSVP: 麻风树SVP; AdSVP: 猕猴桃SVP; IbsVP: 甘薯SVP; AtSVP: 拟南芥SVP; OsSVP: 水稻SVP。

个高度保守的亮氨酸Leu (L)位点(图5, 红框实线框)。此外, 在BpFLC蛋白K2亚域及BpSVP蛋白的K2亚域均存在影响蛋白互作的亮氨酸拉链结构模

体(motif)。上述高度保守的氨基酸位点以及亮氨酸拉链, 有可能对BpFLC或BpSVP蛋白自身聚合起着重要作用。



## 讨 论

在植物的生命周期中, 由营养生长向生殖生长的转变是至关重要的, 开花是这个转变的开关。开花调节途径中的多种途径共同调节开花途径整合因子, 促使顶端分生组织向生殖器官转变(Blázquez和Weigel 2000; Boss等2004)。从白桦中克隆的*BpFLC*和*BpSVP*基因属于开花抑制因子, 均编码MIKC型蛋白, 均具有MADS域、I域、K域和C域。早期利用酵母双杂交技术, 将拟南芥*AtFLC*、*AtSVP*基因重组到酵母表达载体中, 在AH109中进行双杂交验证, 结果表明*AtFLC*和*AtSVP*存在相互作用(Fujiwara等2008)。本实验室的酵母双杂交实验也已证明*BpFLC*和*BpSVP*这两个蛋白不存在自激活及毒性作用, 且异源存在互作关系(郑唐春等2015)。为探究*BpFLC*蛋白与*BpSVP*蛋白相互作用的结构域, 本试验构建了*BpFLC*基因的6个截短体(图2-A)以及*BpSVP*基因的6个截短体(图2-B)。BpFLC1(aa1~73)或BpSVP1(aa1~68)均删除了K域和C域, BpFLC2(aa1~173)或BpSVP2(aa1~172)均删除了C域, BpFLC3(aa74~173)或BpSVP3(aa69~172)均只保留了K域, BpFLC4(aa60~208)或BpSVP4(aa60~225)均删除了M域, BpFLC5(aa74~208)或BpSVP5(aa69~225)均只保留了K域和C域, BpFLC6(aa174~208)或BpSVP6(aa173~225)均只保留了C域。根据这些截短体, 可以判断M域、I域、K域和C域4个结构域中, 哪个域起决定作用。

本试验中BpFLC(BpSVP)自身在Y2HGold [pGBKT7-*BpFLC*×pGADT7-*BpFLC*]及Y2HGold [pGBKT7-*BpSVP*×pGADT7-*BpSVP*]的验证表明, 两个蛋白确实能发生自身同源聚合, 可激活下游的所有报告基因(图4)。此外, BpFLC2(aa1~173, MIKC域)、BpFLC3(aa74~173, K域)、BpFLC4(aa60~208, IKC域)、BpFLC5(aa74~208, KC域)均含有K域, 结果表明它们都能与BpFLC蛋白相互作用, 能激活酵母的4个报告基因*AUR1-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1*, 在QDO/X/A平板上均呈蓝色菌落(图4-A), 推测K域在互作验证中起关键性作用。在QDO/X/A平板培养的早期, 菌落长势及颜色深浅并不相同(图4-A), 表明BpFLC蛋白的其他结构域(M、I或C域)可能会影响(增强或削弱)K域对

BpSVP蛋白的作用强度。同样, BpSVP2~5的K域也在与BpSVP互作中起关键作用(图4-B), 其作用强弱也可能会受到其他结构域(M、I或C域)的影响。这和汤青林等(2012, 2013)对十字花科的芥菜*BjSVP*和*BjFLC*的结构域筛选结果相类似。

本试验推断出到K域是BpFLC或BpSVP同源二聚化的关键结构域。它们的K域含有七价重复区域构成的亚域, 即K1亚域、K2亚域和K3亚域(Fan等1997; Yang等2003)。经过对K1~3亚域的同源比对发现K1、K2和K3亚域的保守性存在差异, 且 $\alpha$ 螺旋数目、位置均存在不同(图5), 这些数据表明, K1~3亚域对BpFLC或BpSVP蛋白自身聚合的贡献并非一致。这也和Yang等(2003)在拟南芥中利用EMSA和酵母双杂交实验验证的MIKC型蛋白K域的亚域对蛋白互作的贡献存在差异的结果是一致的。同时序列比对发现, K域中存在多个亮氨酸拉链(图5), 鉴于亮氨酸拉链在生物学上能促使蛋白-蛋白相互靠近, 形成二聚体, 这在其他含有亮氨酸拉链结构域的蛋白中已经得到证实, 如高等植物拟南芥、水稻、玉米中的*LBD*基因(卢寰和时振英2013)、*WRKY*家族(郝林和徐昕2004)、*bZIP*家族(Dai等2013)等。亮氨酸拉链的存在或许能增加BpFLC及BpSVP同源二聚体存在互作的证据。早期利用酵母双杂交已经证明, MIKC型蛋白中高度保守的疏水残基及控制性残基在异源二聚体互作中起重要作用(Fujiwara等2008)。那么在白桦BpFLC及BpSVP蛋白的同源互作中, 这些K域及疏水残基起到什么作用, 还有待进行下一步的分析。

## 参考文献

- 卞丽萍, 岳金权, 张国珍, 杨传平(2001). 不同地理种源速生白桦化学组分. 东北林业大学学报, 38 (10): 12~14
- 郝林, 徐昕(2004). 植物转录因子WRKY家族的结构及功能. 植物生理学通讯, 40 (2): 260~265
- 李天芳, 姜静, 杨传平, 刘桂丰(2008). 我国白桦育种研究概况. 江苏林业科技, 32 (2): 47~49
- 卢寰, 时振英(2013). 高等植物特有的*LBD*基因的分子生物学功能研究进展. 植物生理学报, 49 (9): 833~846
- 汤青林, 丁宁, 李念祖, 王志敏, 宋明(2013). 芥菜开花负调因子*SVP*及*FLC*同源互作域筛选和作用强度分析. 园林学报, 40 (4): 675~684
- 汤青林, 李念祖, 丁宁, 陈竹睿, 宋明, 王志敏(2012). 芥菜开花调控蛋白*SVP*与*FLC*酵母表达载体的构建及其相互作用研究. 园艺学报, 39 (6): 1175~1182
- 汤青林, 许俊强, 宋明, 王志敏(2011). 芥菜开花信号整合子的两个

- 核心转录因子FLC和SVP相互作用的体外检测. 园艺学报, 38 (12): 2317~2324
- 詹亚光, 杨传平(2002). 白桦愈伤组织的高效诱导和不定芽分化. 植物生理学通讯, 38 (2): 111~114
- 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光, 付丽楠, 何之龙, 王翀(2010). 白桦单细胞培养体系的建立. 植物生理学通讯, 46 (4): 370~374
- 郑唐春, 王英, 臧丽娜, 王亚军, 曲冠证, 夏德安(2011). 柞柳类锌指基因*ThZFL*酵母诱饵表达载体的构建及其表达验证. 东北林业大学学报, 39 (12): 4~8, 15
- 郑唐春, 臧丽娜, 代丽娟, 刘彩霞, 曲冠证(2015). 白桦开花抑制因子BpFLC与BpSVP酵母表达载体的构建及互作验证. 东北林业大学学报, 43 (8): 64~70
- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005). *FD*, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science*, 309 (5737): 1052~1056
- Blázquez MA, Weigel D (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, 404 (6780): 889~892
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, 16 (S): 18~31
- Dai M, Xue Q, McCray T, Margavage K, Chen F, Lee JH, Nezames CD, Guo L, Terzaghi W, Wan J et al (2013). The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (2): 517~534
- de Folter S, Immink RGH, Kieffer M (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *Plant Cell*, 17 (5): 1424~1433
- Fan HY, Hu Y, Tudor M, Ma H (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J*, 12 (5): 999~1010
- Fujiwara S, Oda A, Yoshida R, Niinuma K, Miyata K, Tomozoe Y, Tajima T, Nakagawa M, Hayashi K, Coupland G et al (2008). Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (11): 2960~2971
- Giakountis A, Coupland G (2008). Phloem transport of flowering signals. *Curr Opin Plant Biol*, 11 (6): 687~694
- Hartmann U, Höhmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 21 (4): 351~360
- Immink RGH, Gadella TWJ, Ferrario S, Busscher M, Angenent GC (2002). Analysis of MADS box protein~protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (4): 2416~2421
- Lee JH, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH (2007). Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 21 (4): 397~402
- Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 15 (1): 110~120
- Liu C, Zhou J, Bracha-Drori K, Yalovsky S, Ito T, Yu H (2007). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, 134 (10): 1901~1910
- Michaels SD, Amasino RM (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11 (5): 949~956
- Michaels SD, Amasino RM (2000). Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ*, 23 (11): 1145~1153
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14 (S): 111~130
- Nougalli TI, Borst J, de Vries S, Angenent G, Immink R (2006). *In vivo* imaging of MADS box transcription factor interactions. *J Exp Bot*, 57 (1): 33~42
- Sheldon CC, Conn AB, Dennis ES, Peacock WJ (2002). Different regulatory regions are required for the vernalization~induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell*, 14 (10): 2527~2537
- Simpson GG, Dean C (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, 96 (5566): 285~289
- Yang YZ, Fanning L, Jack T (2003). The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *Plant J*, 33 (1): 47~59
- Yang YZ, Jack T (2004). Defining subdomains of the K domain important for protein~protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol Biol*, 55 (1): 45~59