

基于 EST 库的枳 APETALA2 基因 cDNA 克隆及其表达分析

宋长年, 房经贵*, 王 晨, 上官凌飞, 章 镇

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 根据物种间同源基因相对保守的特点, 利用生物信息学方法以拟南芥 *APETALA2* cDNA 序列作为模板, 对柑橘 EST 数据库进行同源检索筛选, 克隆了柑橘 *APETALA2* 基因的 cDNA 序列, 并以枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 花 cDNA 为模板, 根据以上 cDNA 序列设计特异引物, 利用 RACE 技术分别获得该基因的 5' 和 3' 末端, 序列拼接后获得枳的 *APETALA2* cDNA 全长。该 cDNA 全长为 1 980 bp, 命名为 *PtrAP2*。*PtrAP2* 核苷酸序列有一个 1 539 bp 完整的开放读码框 (ORF), 5' 末端起始密码子 ATG 其始于 290 bp, 3' 末端非翻译区为 152 bp, 其中含有 27 bp 的 P10y⁺ (A)。该基因已在 GenBank 基因数据库注册, 注册号为 EU883665。推导该 cDNA 编码 512 个氨基酸, 与苹果、矮牵牛和拟南芥中相应序列同源性分别为 59.1%、59.7% 和 63.8%。序列分析表明, *PtrAP2* 除了具备完全保守的核定位信号序列 (KKSR) 外, 还具有两个高度保守的重复序列即 AP2 结构域。分别采用半定量 RT-PCR 和 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 方法分析 *PtrAP2* 在枳叶、茎、根、花和果等不同器官中的表达水平, 结果一致表明 *PtrAP2* 在各个器官中的表达水平不同, 花中的表达量最高, 果实中的表达量最低。

关键词: 柑橘; 枳; 花器官发育; 基因; 表达分析

中图分类号: S 666; Q 78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 06-0799-08

Cloning and Expression Analysis of APETALA2 Gene from *Poncirus trifoliata* Based on EST Database

SONG Chang-nian, FANG Jing-gui*, WANG Chen, SHANGGUAN Ling-fei, and ZHANG Zhen

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Based on the relative conservation of plant homologous genes, a full-length citrus homologue of *APETALA2* was bioinformatically cloned by search of citrus EST database via *Arabidopsis thaliana* corresponding sequence. Accordingly, the 5' - and 3' -end sequences were obtained from cDNA of opening flower of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. by RACE with two gene-specific primers designed on the basis of the citrus sequence. The 1 980 bp complete cDNA, designated as *PtrAP2*, contained an open reading frame (ORF) of 1 539 nucleotides and 289 bp of 5' -untranslated region (UTR) and a 152 bp 3' -UTR. The sequence has been deposited in GenBank database with the accession number of EU883665. The deduced amino acid sequence of *PtrAP2* (512 residues) showed 59.1%, 59.7%, 63.8% identity with those of *Malus domestica*, *Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, respectively. *PtrAP2* amino acid sequence contained a putative nuclear localization signal sequence (KKSR) and two highly conserved AP2 domains. The semi-quantitative RT-PCR and SYBR Green I Real-time RT-PCR were employed to analyze the expression of *PtrAP2* in different organs, revealing similar expression profiles in leaf, stem, root, flower, fruit, in which the flower and fruit exhibited the highest and the lowest expression, respectively.

Key words: *Citrus*; *Poncirus trifoliata*; flower; gene; expression

收稿日期: 2008 - 10 - 06; 修回日期: 2009 - 02 - 04

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (109084); 南京农业大学人才基金项目 (804066)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fanggg@njau.edu.cn; Tel: 025-84399069)

*APETALA2*是拟南芥一系列调节花发育的重要基因之一。*AP2*编码一个转录因子,其最明显的功能是参与花器官和种子发育调控 (Jofuku et al, 1994; Vijayraghavan et al, 2005)。*AP2*在拟南芥所有营养器官及种子发育的各个阶段都有表达 (Kunst et al, 1989; Shannon & Meeks-Wagner, 1993),它不仅决定花器官的发育、花器官数量 (Chen, 2004),而且影响种子的产量 (Jofuku et al, 2005; Ohto et al, 2005)。目前已经从苹果 (周盛梅等, 2006)、草莓 (宿红艳等, 2005)、拟南芥 (Jofuku et al, 1994)、玉米 (Chuck et al, 1998; Lauter et al, 2005)、矮牵牛 (Maes et al, 2001)等植物中克隆到了*AP2*的同源基因。而有关枳*APETALA2*同源基因的克隆与研究尚未见报道。

枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]是柑橘的重要砧木,也是柑橘学研究的重要材料。它是柑橘基因组学研究,尤其是EST测序以及柑橘分子生物学研究的重要对象 (Cristofani-Yaly et al, 2007)。在枳上开展*AP2*基因功能的分析,对于利用该基因达到调控花器官发育、童期转变以及提高砧木育种效率都有重要的理论价值。作者采用生物信息学的方法以拟南芥*AP2*的基因序列为模板,对柑橘EST数据库 (HarvEST: Citrus, 包含了来源于柑橘属和枳属 89个文库的近 23万个 EST序列)进行同源检索筛选,并对候选的表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 序列进行反复延伸,分别获得柑橘*APETALA2* cDNA的全长序列,并以枳花 cDNA为模板,经 RACE技术和 RT-PCR获得枳的 cDNA全长,命名为 *PtrAP2*。采用半定量 RT-PCR和荧光定量 PCR方法分析 *PtrAP2*在不同器官中的表达情况,结果一致显示 *PtrAP2*在枳叶、茎、根、花、果等各个器官中的表达水平不同,从而表明 *PtrAP2*在不同的器官中的功能存在着很大的差异。

1 材料与方法

1.1 电子克隆

根据不同物种间同源基因的核酸序列相对保守的特点,在 GenBank的核酸 (nr/nt) 数据库中检索拟南芥的*AP2*基因序列 (U12546),并以 U12546序列为探针对柑橘属和枳属 EST数据库进行 BLAST检索,获得与拟南芥*AP2*基因同源的柑橘 EST片段;从获得的柑橘 EST片段中选出同源性最高的一条 CX667315,再对柑橘 EST数据库进行 BLAST检索,得到多条与之高度同源的柑橘 EST序列;将获得的 EST序列用 DNASTar软件进行首尾拼接,获得新的 Contig;以获得的 Contig反复对柑橘 EST公共数据库进行 BLAST检索、拼接,尽可能获得全长 cDNA (张波等, 2008)。

1.2 实验克隆

1.2.1 材料 枳的叶、茎、根、花和果 (直径 0.50 cm) 于 2008年 3月中旬到 5月初采自江苏省太湖常绿果树技术推广中心—苏州科学研究所。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 (由本实验室保存。PowerScript™反转录酶购自 Clontech公司, DNase酶、LA-Taq酶、Ex-Taq酶、pMD-18T载体、dNTP、DNA Marker购自 TaKaRa公司, Trizol Reagent购自 Invitrogen公司, 荧光定量染料 SYBR Green 购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, DNA回收试剂盒、DL 2000 Plus DNA Marker为北京全式金生物技术有限公司生产。各种引物由上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 合成,其编号及序列见表 1。

1.2.2 RNA的提取与纯化 花组织总 RNA的提取按照 Trizol Reagent说明书进行。mRNA的纯化采用 Promega公司生产的 PloyA Ttract mRNA Isolation System 试剂盒进行。

1.2.3 cDNA合成 以 mRNA为模板,引物 P01反转录合成 cDNA第 1条链,引物 P02延伸加帽子,空气加热条件下 42℃ 保温 1 h, 75℃ 保温 10 min, 冰上冷却 2 min后, -70℃ 保存备用。

1.2.4 基因 3和 5末端 PCR扩增 以 cDNA为模板用引物 P03/P04进行 PCR扩增获得基因的 3末端。反应体系为 50 μL: LA-Taq酶 0.50 μL, 10×PCR buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL, dNTP Mixture 4 μL, cDNA 2 μL, 引物各 1 μL。反应参数为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5个循环; 94℃

30 s, 70 30 s, 72 3 min, 5个循环; 94 30 s, 68 30 s, 72 3 min, 25个循环; 72 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 回收试剂盒回收目标片段进行 T/A 克隆。DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司完成 (下同)。用引物 P05/P06 进行 PCR 扩增获得基因的 5 末端, 反应参数和反应体系同 3 末端扩增。

1.2.5 基因 ORF 的扩增 以 cDNA 为模板用引物 P07/P08 进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μ L: cDNA 2 μ L, 引物各 2 μ L, Ex-Taq 酶 0.50 μ L, 10 \times PCR buffer (Mg^{2+} plus) 5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, cDNA 2 μ L, 引物各 1 μ L。反应参数同上。

1.2.6 生物信息学分析 利用 DNAMAN5.22 软件对 ORF、3 末端和 5 末端等 3 个序列进行拼接分析; 核苷酸和氨基酸序列分别利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性分析。

表 1 引物序列及预期片段大小

Table 1 Sequence of primers and pre-production length

编号 Code	序列 Sequence (5' - 3')	预期片段大小 /bp Predicted size of amplified product	用途 Use
P01	<u>GCA GGACTGCAGCTGACTGACTAC</u> T ₃₀ VN		cDNA 合成
P02	<u>GACCA GTGGTA TCAACGCA GAGTAC</u> GCGGG		cDNA synthesization
P03	AAC TGGAA GA TGGGAA TCTCA TA TA TGGG	1 200	扩增 <i>PtAP2</i> 基因 3 端
P04	<u>GCA GGACTGCAGCTGACTGACTAC</u>		3' -end amplification
P05	<u>GACCA GTGGTA TCAACGCA GAGTAC</u>	820	扩增 <i>PtAP2</i> 基因 5 端
P06	GGTGGTA GGA TCCGACCA GTGGTA TCAACGCA G		5' -end amplification
P07	<u>GGA TCCA TGTGGGA TCTGAA TGACTCCG</u>	1 539	<i>PtAP2</i> 基因 ORF 扩增
P08	<u>GAGCTC</u> GGA GGGTCTAACAAGGGA GTGGAA TC		Complete ORF amplification
P09	GCTGCCTTCCTTGGATGTGGT	150	扩增 18S rRNA
P10	TGCCCGTTGCTCTGATGATTC		18S rRNA amplification
P11	ATCGTCTAA TCTCTCATTTCTTTCAG	113	定量 RT-PCR
P12	TTTCGGTGCTCTTCCCTCTCTGG		Quantitative RT-PCR

注: 方框和双下划线是相互匹配的引物与接头; 下划线为添加的酶切位点, GAGCTC 为 *Sac*^I, GGATCC 为 *Bam* H^I。

Notes: Frame and double underline shading denotes matching primers or adaptors; GAGCTC and GGATCC underlined in primers indicates restriction enzyme sites of *Sac*^I and *Bam* H^I.

1.3 枳 *PtAP2* 基因的表达分析

分别提取枳叶、茎、根、花和果 (直径 0.50 cm) 等器官的总 RNA, 用 DNase 酶 (RNase free) 消化和氯仿抽提后分别取 2 μ g 以 P01 和 P09 引物反转录合成的 cDNA 做模板, 用 NCBI 新增工具 Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 设计引物 P11 和 P12 进行半定量 RT-PCR 和实时定量 PCR 研究 *PtAP2* 在不同器官中的表达特点。内标基因是利用枳 18S rRNA (GenBank accession number AF206997) 的特异性引物 (P09 和 P10) PCR 扩增获得的长度为 150 bp 的基因片段。利用 Rotar-Gene 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 的反应体系按 SYBR Green (TOYOBO) 说明书进行, 其优化后的反应条件为 95 预变性 60 s; 95 20 s, 57 20 s, 72 20 s, 45 个循环。试验 3 次重复, 试验数据用 LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) 和 Excel 软件分析。

2 结果与分析

2.1 柑橘 *APETALA2* cDNA 全长的电子克隆

利用拟南芥 U12546 为信息探针, 对柑橘 EST 数据库进行 BLAST 检索, 得到一个高相似的 EST 序列 CX667315, 然后以此序列作为种子序列 BLAST 检索柑橘 EST 数据库, 将检出的与种子序列同源性较高的或有部分重叠的 EST 序列 (DY269701、EY809026、EY794932、CX293333、EY744342、

CK665679) 拼接组装为重叠群 (Contig), 再以此重叠群序列重复以上 BLAST检索过程, 反复进行 EST重叠群序列的拼接和比对, 最后获得柑橘 APETALA2的 cDNA全长。

2.2 枳 PtAP2 cDNA全长的获得

根据柑橘 APETALA2的 cDNA全长设计特异引物 P03和 P05, 以枳花器官来源 cDNA为模板, 分别与引物 P04和 P06进行 3 RACE和 5 RACE扩增, 经克隆测序分别得到该基因的 3末端 (823 bp) 和 5末端 (1 195 bp)。利用引物 P07和 P08, 以枳花器官来源 cDNA为模板获得长度为 1 539 bp的全长 ORF。对 3端、5端以及 ORF全长拼接获得枳 APETALA2 cDNA全长为 1 980 bp, 有一个 1 539 bp完整的开放阅读框 (ORF), 289 bp的 5非翻译区 (5 UTR), 152 bp的 3非翻译区 (3 UTR) 以及 27 bp的 poly⁺ (A)。该 cDNA推导编码 512个氨基酸 (图 1)。

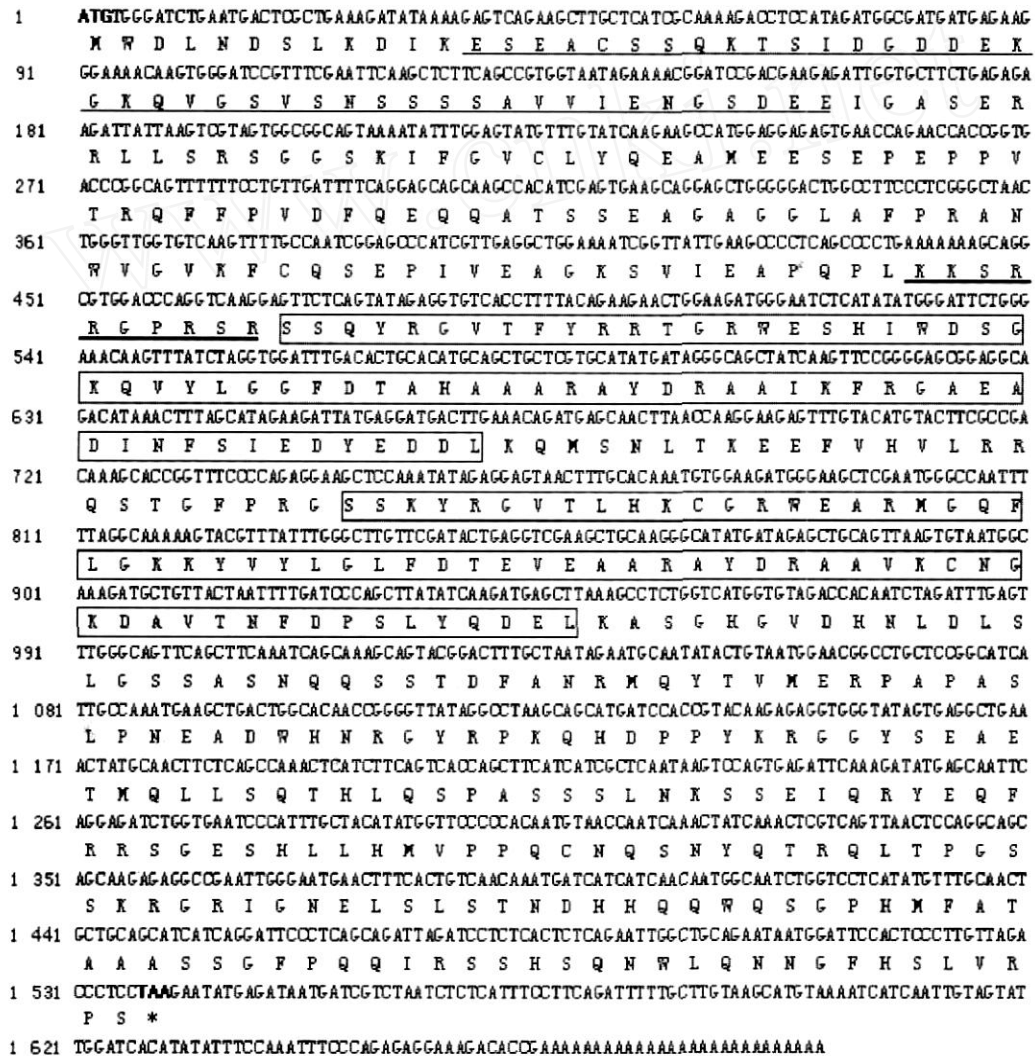


图 1 PtAP2 cDNA全长与推导氨基酸序列

黑体 ATG为起始密码子, 黑体 TAA为终止密码子。方框为两个保守的 AP2结构域即 AP2-R1和 AP2-R2, 下划线表示富含丝氨酸的转录激活区域。粗线表示 10个碱性氨基酸区域内含核定位信号 (KKSRL)。

Fig 1 Nucleotide sequence of complete PtAP2 cDNA and its deduced amino acids

ATG (start codon) and TAA (stop codon) are showed in bold. Two boxes delineate the AP2 domains (AP2-R1 and AP2-R2). Underlined residues indicate amino acids which are highly serine-rich region that serves as a transcriptional activation domain. Thick line highlights the putative nuclear localization signal sequence (KKSRL) with 10-amino acids.

2.3 枳 APETALA2氨基酸序列分析

序列分析表明 *PtAP2* 编码的氨基酸与其它植物的 *AP2* 氨基酸有着高度保守的序列即 *AP2* 结构域，该结构域可以识别 DNA 顺式作用元件 (Cis-acting Element) 并与之结合 (Kim et al., 2005)。在其第 146 ~ 156 氨基酸之间还含有 1 个碱性区域，内含核定位信号 KKSR (Chelsky et al., 1989)。在其 N 端第 13 ~ 54 氨基酸之间有一富含丝氨酸的转录激活区域作为 3 个经典的转录因子序列之一 (另外两个是 *AP1* 和 *LFY*) 具有促进该基因转录的作用 (Michell & Tian, 1989)。以上这些结果表明，我们已经从枳中分离出 *AP2* 的同源基因。用 DNAMAN5.22 软件对枳与苹果 (周盛梅等, 2006)、拟南芥 (Jofuku et al., 1994)、矮牵牛 (Maes et al., 2001) 等 *AP2* 氨基酸序列比较 (图 2)，结果表明 4 个蛋白有着完全相同的核定位信号序列 KKSR (Chelsky et al., 1989) 以及它们的两个 *AP2* 结构域均

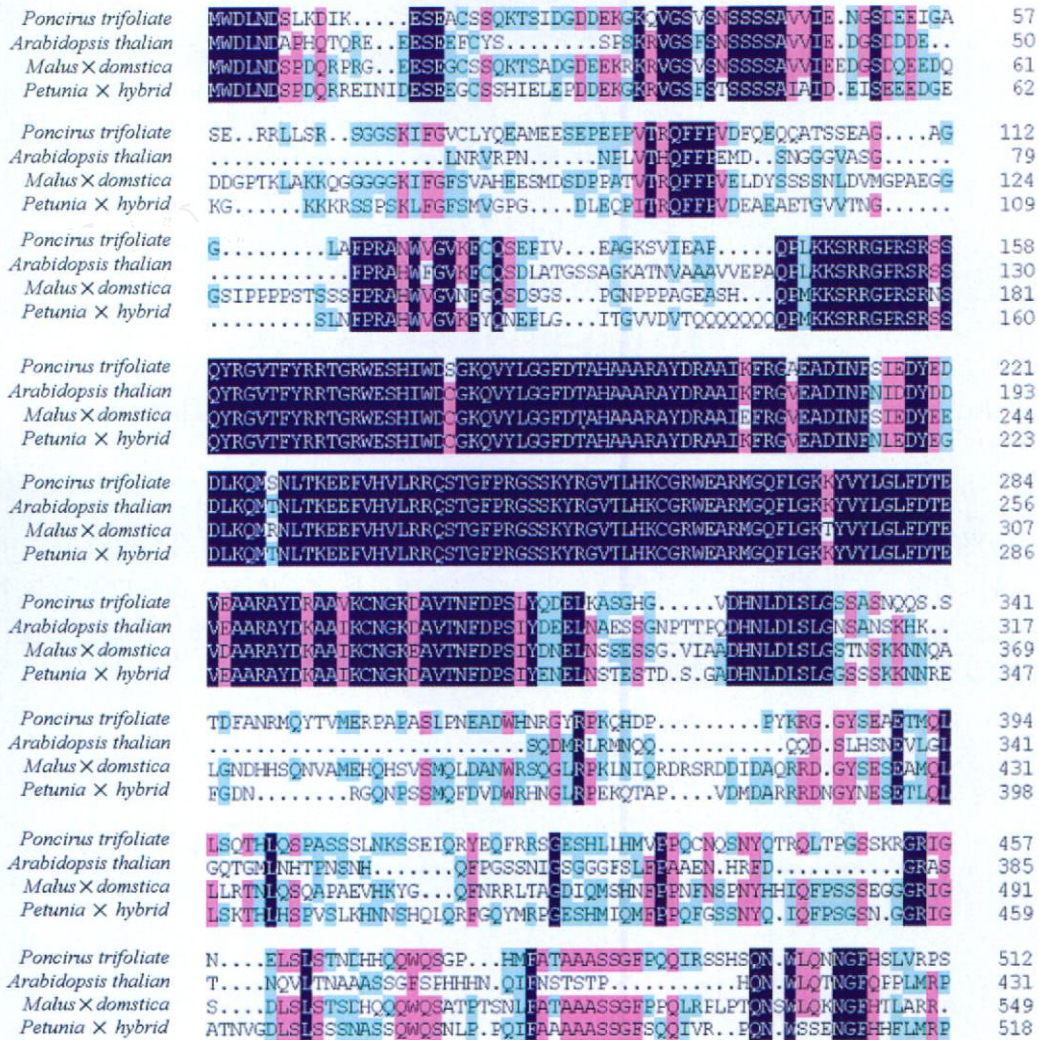


图 2 *PtAP2* 推导序列与苹果、拟南芥和矮牵牛的 *AP2* 氨基酸的同源性比较

相同氨基酸用蓝色域表示；3 氨基酸与 2 氨基酸相似分别用红色或绿色域表示；缺失用省略号表示。序列注册号为：
Poncicus trifoliata (EU883665)；*Malus xdomestica* (AF332215)；*Arabidopsis thaliana* (U12546)；*Petunia xhybrida* (AF132001)。

Fig 2 Comparison of the amino acid sequence of *PtAP2* (EU883665) with those of *Malus domestica* (AF332215), *Arabidopsis thaliana* (U12546) and *Petunia xhybrida* (AF132001)

Blue, red and green boxes highlighted the four identical amino acids, three same amino acids and two same amino acids, respectively. Gaps are shown as dots

具有高度的同源性 (分别为 95.9% 和 96.3%)。枳 *PtAP2* 与苹果 *M-AP2* (AF332215)、拟南芥 *AP2* (U12546)、矮牵牛 *PhAP2A* (AF132001) 的同源性 (59.1%、59.7%、63.8%) 又表明它们在功能上可能存在着一定的不同。

2.4 *PtAP2*在枳不同器官中的表达分析

采用半定量 RT-PCR 法对 *PtAP2* 基因进行器官特异性表达分析, 结果 (图 3) 表明, 在叶、茎、根、花、果等各器官均扩增出大小约为 120 bp 的片段, 经克隆测序大小为 113 bp, 且该片段均为 *PtAP2* 的 3' UTR 片段。*PtAP2* 在上述器官均有表达, 但有一定差异, 在花中的表达水平明显比其它器官高, 其次在根中, 再次在叶和茎中, 在果中的表达水平最低。

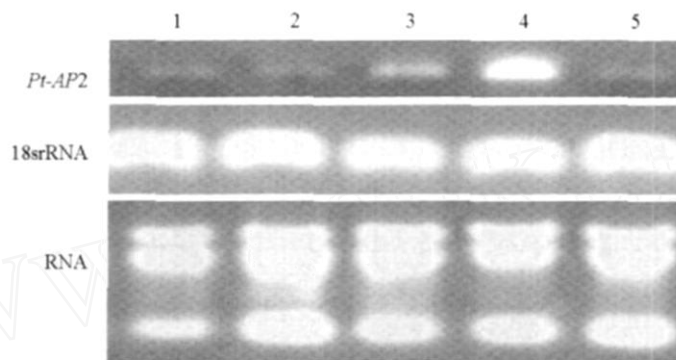


图 3 半定量 RT-PCR 检测 *PtAP2* 基因在枳不同组织中的表达

1、2、3、4、5 分别为叶、茎、根、花、果 (直径 0.50 cm)。

Fig. 3 Expression of *PtAP2* gene in different tissues of *Poncirus trifoliata* by semi quantitative RT-PCR

1. Leaf; 2. Stem; 3. Root; 4. Flower; 5. Fruit (diameter is 0.50 cm).

进一步用荧光定量 PCR 方法检测在各器官中的表达量, 结果 (图 4) 表明 *PtAP2* 在花中的表达量最高, 其次为根, 在果实中的表达量最少, 叶和茎的表达量相当。*PtAP2* 在枳以上等各个器官均能表达反映该基因编码的蛋白是一种普遍的转录因子, 在枳的生长阶段的转变、花器官形成、种子发育乃至果实发育等整个生长发育阶段可能都起着重要的作用。

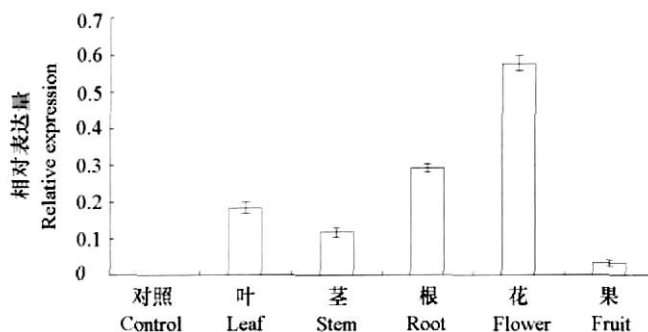


图 4 荧光定量 PCR 检测 *PtAP2* 基因在枳不同组织中的表达

对照为水。每个柱形图表示 *PtAP2* 在不同器官中的相对表达量。试验重复 3 次, 标准误差在图中标出。

Fig. 4 Expression of *PtAP2* gene in different tissues from *Poncirus trifoliata* by fluorescent quantitative PCR

Control is water. Columnar diagram represents the relative expression levels of *PtAP2* in different organs. Each experiment was repeated three times and standard error was pointed with bars in diagram.

3 讨论

基于对 *AP2* 突变体的分析, 人们发现 *AP2* 基因不仅在花瓣和萼片的形成过程中起重要作用, 而且与 *AP1*、*LFY* 及 *CAL* 等花的分生组织决定基因相互作用, 参与花的分生组织的早期建立 (Kunst et al, 1989; Shannon & Meeks-Wagner, 1993)。在玉米中的研究发现, *glossy15* 在幼叶向成熟叶以及营养生长向生殖生长的转型方面具有重要调控作用 (Lauter et al, 2005), 因此该基因在植物的整个生长发育过程, 尤其是发育阶段的转变与生殖器官的发育中发挥重要作用。本研究从枳花 cDNA 中成功分离出 *AP2* 的同源基因 *PtAP2*, 该基因编码的蛋白质具有 *AP2* 家族典型的特征, 即含有保守性很高的两个识别并结合 DNA 顺式作用元件的 *AP2* 结构域 (Kim et al, 2005)、一个丝氨酸丰富的转录激活结构域 (Michell & Tian, 1989) 和一段核定位序列 KKSR (Chelsky et al, 1989), 这也说明 *PtAP2* 的编码产物亦为转录因子。

氨基酸序列分析表明, *PtAP2* 与拟南芥 *AP2* (Jofuku et al, 1994)、矮牵牛 *PhAP2A* (Maes et al, 2001) 的氨基酸序列同源性分别为 59.7% (U12546) 和 63.8% (AF132001), 说明在核定位信号序列和 *AP2* 结构域之外的序列存在一定差别, 因此这些物种的 *AP2* 同源基因的功能可能存在一定的差异。

Jofuku 等 (1994) 报道, *AP2* 不仅在拟南芥的花分生组织和四轮花器官中表达, 在茎、叶等营养器官中亦有表达。宿红艳等 (2005) 采用 RT-PCR 方法分析 *SAAP2* 在草莓不同组织中的表达情况, 结果显示 *SAAP2* 在草莓营养组织、花芽以及不同花器官中均有表达。本试验通过半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 研究结果发现 *PtAP2* 在枳叶、茎、根、花、果等各个器官均有表达, 但表达水平有着一定的差异, 其中在花和果实中的表达量最高与最低。基因表达的结果说明了 *PtAP2* 对于枳营养与生殖器官的发育都具有一定作用, 但作用的大小有着差异。本研究在进行表达分析时, 为了保证半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 引物的可靠性将其引物设计在该基因的 3 非翻译区 (3' UTR) 而且对半定量 PCR 产物克隆测序, 且后续的 southern 杂交显示 (文中未列出) 表明 *PtAP2* 在枳的基因组中为单一的拷贝存在, 这与拟南芥的 *AP2* (Jofuku et al, 1994) 和矮牵牛的 *PhAP2A* (Maes et al, 2001) 研究结果是一致的。

为了更好地认识 *PtAP2* 的功能, 我们将利用已经构建的 *PtAP2* 正义和反义表达载体转化枳开展进一步的研究。

References

- Chelsky D, Ralph R, Jonak G. 1989. Sequence requirements for synthetic peptide mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, 9: 2487 - 2492.
- Chen X. 2004. A micro RNA as a translational repressor of *APETALA2* in *A. thaliana* flower development. *Science*, 303: 2022 - 2025.
- Chuck G, Meeley R B, Hake S. 1998. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene indeterminate spikelet 1. *Genes Dev*, 12: 1145 - 1154.
- Cristofani-Yaly M, Berger I J, Targon M L P N, Takita M A, Dorta S O, Freitas-Astúa J, Souza A A, Boscarolo-Camargo R L, Reis M S, Machado M A. 2007. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico hybridization. *Genet and Mol Biol*, 30: 972 - 979.
- Jofuku K D, Boer B G W D, Montagu M V, Okamura J K. 1994. Control of *A. thaliana* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 6 (9): 1211 - 1225.
- Jofuku K D, Omidyar P K, Gee Z, Okamura J K. 2005. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (8): 3117 - 3122.
- Kim S, Soltis P S, Wall K, Soltis D E. 2005. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2*-like gene family. *Mol Biol Evol*, 23: 107 - 120.
- Kunst L, Klenz J E, Martinez-Zapater J, Haughn G W. 1989. *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *A. thaliana*.

- ana. *Plant Cell*, 1: 1195 - 1208.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose S P. 2005. *microRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (26): 9412 - 9417.
- Maes T, van de Steene N, Zethof J, Karimi M, D'Hauw M, Mares G, van Montagu M, Gerats T. 2001. *Petunia AP2*-like genes and their role in flower and seed development. *Plant Cell*, 13 (2): 229 - 244.
- Ohto M, Fischer R, Goldberg R B, Nakamura K, Harada J J. 2005. Control of seed mass by *APETALA2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (8): 3123 - 3128.
- Ramakrishna C, Ruijter J M, Lekanne Depreza R H, Mooman A F M. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339: 62 - 66.
- Shannon S, Meeks-Wagner D R. 1993. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 5: 639 - 655.
- Su Hong-yan, Zhou Sheng-mei, Wang Lei, Zhang Xian-sheng, Shu Huai-rui. 2005. Cloning and expression analysis of *APETALA2* homologous genes in strawberry. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 25 (10): 1937 - 1942. (in Chinese)
- 宿红艳, 周盛梅, 王 磊, 张宪省, 束怀瑞. 2005. 草莓 *APETALA2*同源基因的克隆及表达分析. *西北植物学报*, 25 (10): 1937 - 1942.
- Vijayraghavan U, Prasad K, Meyerowitz E. 2005. Specification and maintenance of the floral meristem: Interactions between positively-acting promoters of flowering and negative regulators. *Current Science*, 89 (11): 1835 - 1843.
- Zhang Bo, Li Xian, Chen Kun-song. 2008. Molecular cloning of lipoxygenase gene family members in kiwifruit based on EST database. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (3): 337 - 342. (in Chinese)
- 张 波, 李 鲜, 陈昆松. 2008. 基于 EST库的猕猴桃脂氧合酶基因家族成员的克隆. *园艺学报*, 35 (3): 337 - 342.
- Zhou Sheng-mei, Su Hong-yan, Wang Lei, Zhang Xian-sheng, Shu Huai-rui. 2006. Cloning and transformation of *apetala2* homologous genes from apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (2): 239 - 243. (in Chinese)
- 周盛梅, 宿红艳, 王 磊, 张宪省, 束怀瑞. 2006. 苹果 *apetala2*同源基因的克隆和转化研究. *园艺学报*, 33 (2): 239 - 243.

图书推荐

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子公司、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。