

# 百脉根 *LjCYC1* 基因致非洲紫罗兰花形改变

杨梦婷, 徐 京, 庞基良\*

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

**摘要:** 利用农杆菌介导法将百脉根花对称性基因 *LjCYC1* 转入非洲紫罗兰, 进一步探讨其作用和功能。非洲紫罗兰 *LjCYC1* 转化植株的表型发生以下变化: (1) 花的对称性明显改变, 由辐射对称变为两侧对称, 出现频率为 14.3%; (2) 花瓣向花冠基部裂开, 且花瓣数减少, 出现频率为 57.1%; (3) 部分或全部雄蕊花瓣化, 出现频率为 17.1%; (4) 雌蕊花瓣化或退化, 出现频率为 11.4%。

**关键词:** 百脉根; 非洲紫罗兰; *LjCYC1*; 花对称性

**中图分类号:** S 541<sup>+</sup>6; S 682      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0513-353X (2020) 04-0708-09

## Flower Shape Changes of African Violets Caused by *LjCYC1* Gene in *Lotus japonicus*

YANG Mengting, XU Jing, and PANG Jiliang\*

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** In order to investigate the function of *LjCYC1* gene, floral symmetry gene *LjCYC1* in *Lotus japonicus* was transformed into *Saintpaulia ionantha*, by using *Agrobacterium*-mediated transformation technology. Phenotypic observations showed as following: (1) The floral symmetry was obviously changed, the flowers of 14.3% transferred from actinomorphy to bilateral symmetry; (2) The corolla of 57.1% flowers crack deeply to the base, and the shape of petals changed, and number of petals reduced; (3) The stamens of 17.1% flowers conversed partially or whole into petal-like structures; (4) The pistil of 11.4% flowers conversed into petal-like structures or degenerated.

**Keywords:** *Saintpaulia ionantha*; *Lotus japonicus*; *LjCYC1*; floral symmetry

花的对称性 (floral symmetry) 作为被子植物花部结构的典型特征, 近年来成为植物发育、进化、生态及分子生物学的研究重点之一。被子植物的花形根据其对称面的有无分为 3 种 (Endress, 2001): 辐射对称花 (actinomorphy, 具有多个对称面)、两侧对称花 (zygomorphy, 只有一个对称面)、不对称花 (asymmetry, 没有对称面)。自从 Luo 等 (1996, 1999) 从金鱼草中克隆了 *CYCLOIDEA* 后, 其花形分子调控机制已经研究得比较清楚, 主要是由调控花背部特性的 *CYC* 基因、*DICHOTOMA* (*DICH*) 基因、*RADIALIS* (*RAD*) 基因和调控腹部特性的 *DIVARICATA* (*DIV*) 基因决定。花对称性的研究除在金鱼草上取得很大进展外, 研究对象已扩展到金鱼草的近缘类群 (Green et al., 2010), 如菊科 (Tähtiharju et al., 2012; 黄笛 等, 2017)、苦苣苔科 (Wang et al., 2006; Du & Wang,

收稿日期: 2020-01-17; 修回日期: 2020-03-03

基金项目: 杭州市科技计划项目 (20191203B07)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: pangrenshuilian@aliyun.com)

2008; Gao et al., 2008)、豆科 (Feng et al., 2006; Wang et al., 2008; Xu et al., 2013)、忍冬科和川续断科 (Howarth et al., 2011)、十字花科 (Busch & Zachgo, 2007; Bushch et al., 2012) 等, 甚至扩展到单子叶植物禾本科 (Yuan et al., 2009; Mondragon-Palomino & Trontin, 2011)、兰科 (Mondragon-Palomino & Theissen, 2009) 等。

系统发育分析表明, 在被子植物进化过程中 CYC 类基因发生过两次大的复制事件, 最终形成 CYC1、CYC2 和 CYC3 等三大分支 (Howarth & Donoghue, 2006)。控制花对称性的关键基因 CYC 和 DICH 均属于 CYC2 分支成员, 而关于 CYC1 和 CYC3 分支功能的研究很少, 其功能仍不清楚 (Howarth & Donoghue, 2006), 只在拟南芥中发现 CYC1 同源基因 TB1 抑制玉米侧枝的形成 (Aguilar-Martínez et al., 2007)。Feng 等 (2006) 从豆科植物百脉根 (*Lotus japonicus*) 中获得了 4 个 CYC 的同源基因, 发现 *LjCYC2* 为组成型表达, 所有的花瓣均呈现背部花瓣属性; *LjCYC1* 编码的蛋白质特异定位于细胞核内, 起调控作用 (Qin et al., 2004); 通过 RNAi 基因沉默技术抑制 3 个 *LjCYC* 基因的表达, 会引起花背腹轴分化的丧失, 所有的花瓣都与腹瓣相似 (Wang et al., 2010)。在烟草中转化正义 *LjCYC3* 的植株表现为花瓣和雄蕊数减少; 而转化反义 *LjCYC3* 的植株表现出 2 朵花有一定程度的融合, 花冠、萼片褪色等现象 (张寒英 等, 2011)。花生转 *LjCYC2* 基因  $T_1$  代植株的花出现多种新的表型, 如龙骨瓣翼瓣化, 旗瓣消失、开裂等 (温世杰 等, 2015)。

非洲紫罗兰 (*Saintpaulia ionantha*) 为苦苣苔科非洲苦苣苔属多年生草本喜阴植物, 植株矮小, 四季皆可开花, 花色丰富, 花与叶均有较高的观赏价值。Narendrahe 和 Mohandas (2003) 利用根癌农杆菌将葡聚糖酶——几丁质酶基因转入非洲紫罗兰。本研究中通过农杆菌介导法将百脉根 *LjCYC1* 转入非洲紫罗兰, 进一步探讨 *LjCYC1* 的作用和功能, 以期获得花形改变的非洲紫罗兰转基因植株, 为花卉植物的花形调控提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 受体材料及其对潮霉素敏感性的检测

以非洲紫罗兰 (*Saintpaulia ionantha*) 试管苗的幼叶为转基因受体材料。取无菌幼嫩叶片, 划伤后分别接种到含 0、10、15、20、25、30 和 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素 (Hygromycin, Hyg) 的诱芽培养基中, 培养 30 d 后观察生长状况, 统计外植体的死亡率, 选择可以抑制受体材料生长的最低浓度 Hyg 作为筛选压。每个处理 30 块叶片, 重复 3 次。

### 1.2 叶盘法转化非洲紫罗兰

含百脉根 *LjCYC1* 质粒 pCAMBIA1301-*LjCYC1* 的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 由中国科学院上海植物生理生态研究所惠赠。在无菌条件下切取非洲紫罗兰幼叶 (长约 1 cm), 划伤表面, 接种到愈伤组织诱导培养基 (MS + 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA + 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 + 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉); 预培养 2 d 后用农杆菌 (含 Hyg 抗性基因、GFP 基因) 侵染液 (含 Km 和 Rif) 侵染 15 ~ 20 min, 然后用无菌滤纸吸干菌液, 转接到共培养培养基 (愈伤组织诱导培养基 + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  AS), 黑暗条件下共培养 3 d; 用含 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢霉素 (Cef) 的无菌水将叶片冲洗 3 ~ 5 次, 放到无菌滤纸上晾干后接种到延迟培养基 (MS + 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA + 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef + 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Hyg + 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 + 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉); 延迟培养 7 ~ 10 d 后转入筛选培养基 (MS + 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA + 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef + 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Hyg + 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 + 5

g · L<sup>-1</sup> 琼脂粉) 中, 待转化受体形成愈伤组织或分化不定芽后转入分化培养基中继续抗性筛选, 最后将分化的丛生苗转入生根培养基, 待苗长出根系后移栽, 置人工气候室培养。

### 1.3 cDNA 的合成和检验

用 CTAB 法和 Trizol 法分别提取非洲紫罗兰转 *LjCYC1* 植株叶片的 DNA 和 RNA, 并以野生型植株为对照。RNA 经反转录后 (按照 CWBIO 公司的 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 试剂盒使用说明书进行), 用 Actin 引物对 cDNA 进行检验。PCR 反应体系为 25 μL: 16 μL ddH<sub>2</sub>O、2.5 μL 10× PCR Buffer、2.0 μL 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs、1.0 μL Actin 正向引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>)、1.0 μL Actin 反向引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>)、2.0 μL cDNA 模板和 0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后分析比较。引物 ActinF 为 5'-GGAGAAGATCTGGCATCACA-3', ActinR 为 5'-CCTCCAATAAAGACACTGTA-3'。

### 1.4 转 *LjCYC1* 非洲紫罗兰的 GFP 及 PCR 检测

取转 *LjCYC1* 再生非洲紫罗兰植株的根做成压片, 在蔡氏荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP) 的表达情况。以非洲紫罗兰转基因植株的基因组 DNA 和野生型基因组 DNA 为模板, 用 *LjCYC1* 特异性引物 (CYC-F1: 5'-AGAAGGACAGGCACAGCA-3', CYC-R1: 5'-TTTGGAGACATAGGGAAG-3') 和 *GFP* 基因特异性引物 (GFP-F: 5'-GTCAGTGGAGAGGGTGAAGG-3', GFP-R: 5'-AAAGGGCAGATTGTGTGGAC-3') 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应结束后, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 转 *LjCYC1* 非洲紫罗兰不同部位的 RT-PCR 检测

为了解 *LjCYC1* 在非洲紫罗兰各器官中的表达情况, 提取转化植株的根, 营养生长期的叶, 开花期的叶、花序梗、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊的总 RNA, 以 *Actin* 作为内参基因, 对所有 cDNA 模板进行半定量 RT-PCR 分析。用 *LjCYC1* 特异性引物对反转录产物进行 PCR 扩增, *Actin* 引物序列、PCR 反应体系及反应条件同 1.4。

### 1.6 转基因植株的表型观察

经过分子检测的转基因和野生型非洲紫罗兰同时移栽到泥炭: 珍珠岩 = 7:3 的基质中, 种植于杭州师范大学生命与环境科学学院人工气候室, 在温度为 (23 ± 2) °C, 14 h 光照/10 h 黑暗条件下培养。对转基因植株的生长和花器官特征进行观察记录, 并与野生型植株进行比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Hyg 筛选压的确定

潮霉素 (Hygromycin B, Hyg) 对离体培养非洲紫罗兰叶片的生长及芽再生有强烈的抑制作用, 由表 1 可见, 在 30 和 40 mg · L<sup>-1</sup> Hyg 的筛选培养条件下叶片再生芽受到严重抑制, 全部褐化死亡。鉴于经过一段延迟培养后已有分化迹象的叶片抗性增加, 同时为降低假阳性植株的数量, 本试验中以 30 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg 作为外植体起始筛选压。

**表 1 潮霉素对离体培养非洲紫罗兰叶片芽再生的影响**  
**Table 1 The effect of Hygromycin on bud regeneration on leaves cultured *in vitro* in *Saintpaulia ionantha***

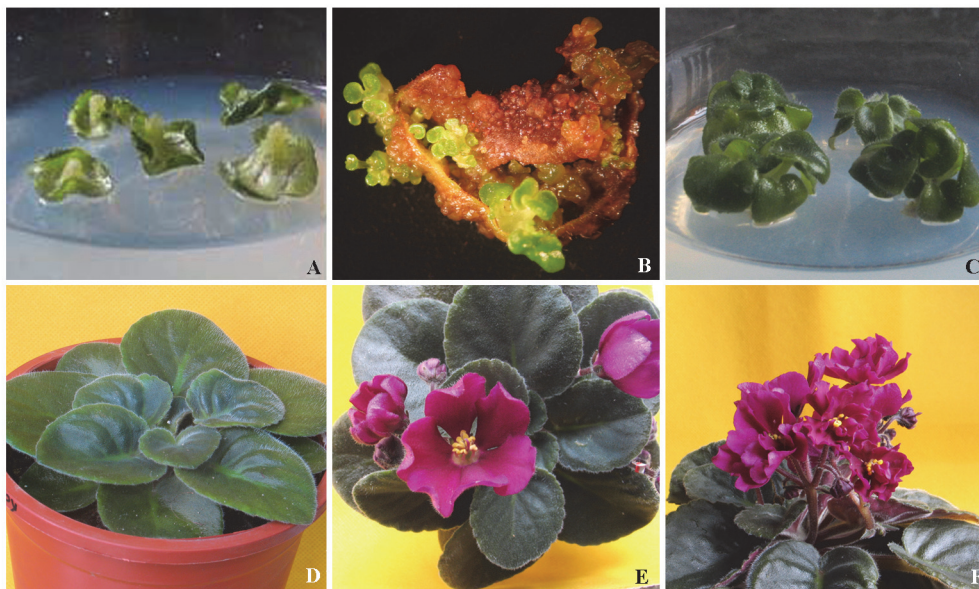
Hyg/ (mg · L <sup>-1</sup> )	再生芽的叶片数 Number of leaf buds of regenerated	芽再生率/% Bud regeneration rate	叶片生长状态 Status of leaf growth
0 (对照 control)	30	100.00	正常生长 Normal growth
10	30	100.00	正常生长 Normal growth
20	11	36.67	生长受抑制 Growth was inhibited
25	4	13.33	褐化 Turned brown
30	0	0	褐化死亡 Turned brown and died
40	0	0	褐化死亡 Turned brown and died

注: 每处理 30 片叶。培养 30 d 后的统计结果。

Note: Each treatment has 30 leaves. Calculated results on 30th day after leaves being cultured *in vitro*.

## 2.2 转基因植株的获得

经农杆菌侵染后的非洲紫罗兰叶片共培养后, 在温度为 (23 ± 2) °C、12 h/12 h 黑暗的培养条件下经过 1 周延迟筛选后, 转入筛选培养基, 30 d 后开始有抗性芽形成。将抗性芽转入分化培养基继续筛选, 待小苗长至 2 cm 时切下转入生根培养基, 长出根系后移栽到花盆 (图 1)。



**图 1 *LjCYC1* 转化非洲紫罗兰的过程**

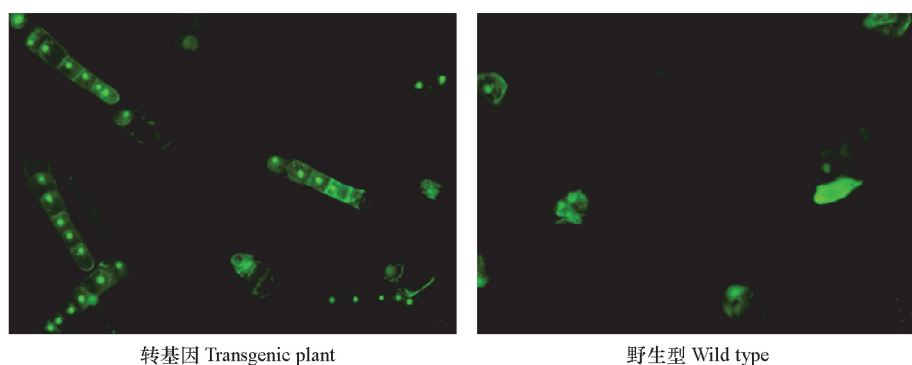
A: 筛选培养 7 d 后的叶片; B: 再生出芽; C: 再生植株生根; D: 移栽 50 d 后的再生植株;  
E: 移栽 150 d, 花瓣深裂; F: 移栽 150 d, 花重瓣化。

**Fig. 1 The process of *LjCYC1* transformed *Saintpaulia ionantha***

A: Leaves cultured for 7 days on screening medium; B: Regenerated buds; C: Rooting of regenerated plants; D: The regenerated plant transplanted for 50 days; E: Transplanted for 150 days, drastic crack on petals; F: Transplanted for 150 days, double flowers.

## 2.3 转基因植株的 GFP 检测

取转 *LjCYC1* 非洲紫罗兰再生植株的根制成压片, 用蔡氏荧光显微镜观察, 在蓝光激发下可清楚地观察到根的细胞核发出绿色荧光, 而野生型的根没有这种现象 (图 2), 这表明 GFP 已经在转基因植株中高效表达。



转基因 Transgenic plant

野生型 Wild type

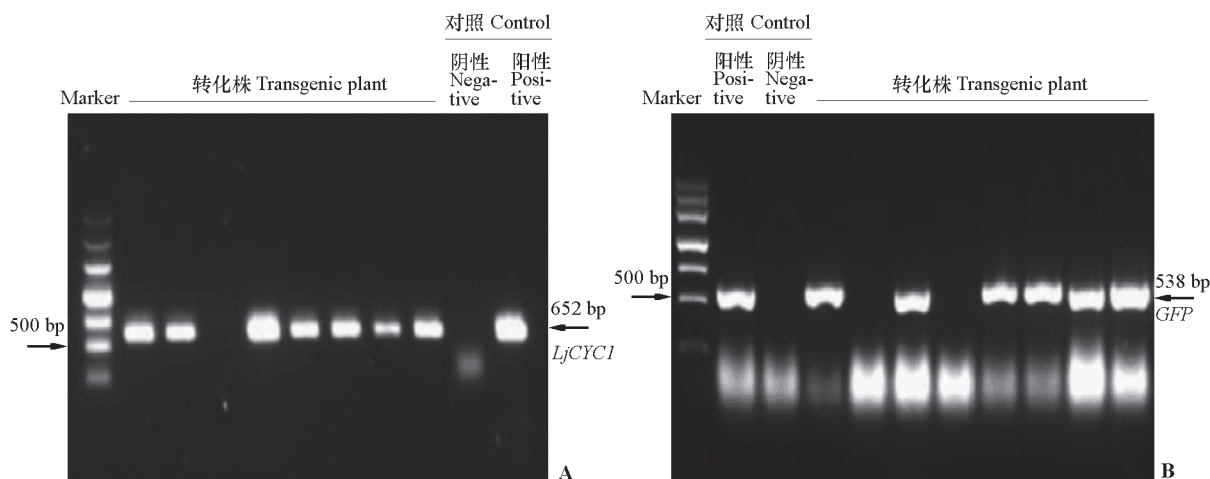
图 2 荧光检测转基因非洲紫罗兰的根细胞

Fig. 2 Observed root cells of transgenic *Saintpaulia ionantha* by fluorescence microscope

## 2.4 转基因植株的 PCR 检测

利用 *LjCYC1* 和 *GFP* 基因引物对随机挑选的 8 株转化再生植株的叶片进行 PCR 扩增检测。*LjCYC1* 扩增结果 (图 3, A) 显示, 其中 7 株扩增出大约 652 bp 的条带。

*GFP* 扩增结果 (图 3, B) 显示, 有 6 株扩增出大约 538 bp 的条带, 而野生型对照均没有扩增出任何条带, 这说明 *LjCYC1* 已初步整合到非洲紫罗兰基因组内。有 1 株只检测出 *LjCYC1* 而没有检测出 *GFP*, 可能是因为非洲紫罗兰基因组具有 *CYC* 的同源基因而导致 *LjCYC1* 基因假阳性扩增的结果。

图 3 *LjCYC1* (A) 和 *GFP* (B) 基因的 PCR 检测结果Fig. 3 PCR analysis of *LjCYC1* (A) and *GFP* (B) gene

## 2.5 RT-PCR 分析 *LjCYC1* 在转基因植株不同器官中的表达

RT-PCR 检测结果 (图 4) 显示, 外源 *LjCYC1* 在转基因非洲紫罗兰根、叶、花序梗、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊都高效表达, 各组织中的表达量大致相同; 营养生长期的叶中表达量高于生殖生长期各个组织中的。

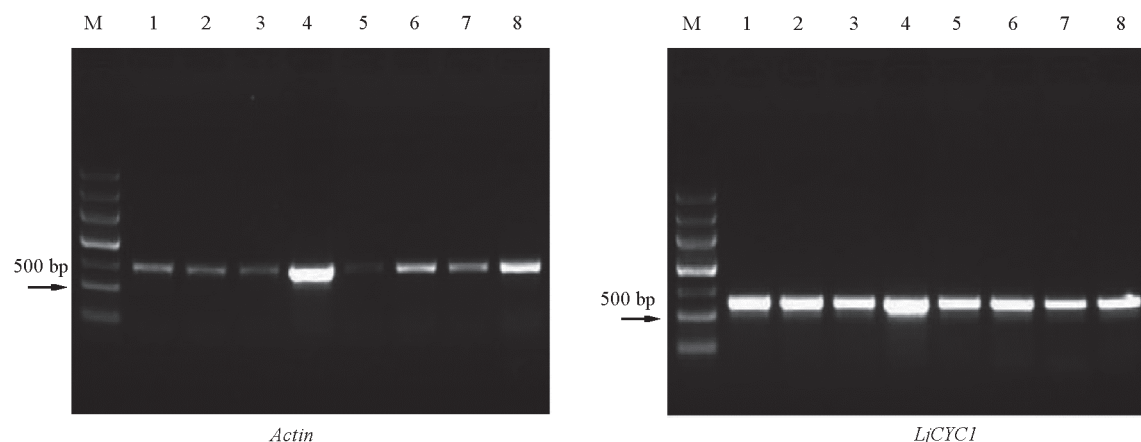


图4 *LjCYCI* 在非洲紫罗兰不同器官表达的 RT-PCR 分析

M: Marker III; 1: 根; 2: 生殖生长期叶; 3: 花序梗; 4: 营养生长期叶; 5: 花萼; 6: 花瓣; 7: 雄蕊; 8: 雌蕊。Actin 作内参。

Fig. 4 RT-PCR analysis of *LjCYCI* gene expression in different organs

M: Marker III; 1: Root; 2: The leaves of reproductive growth period; 3: Peduncle; 4: Leaves of vegetative growth period; 5: Sepals; 6: Petals; 7: Stamen; 8: Pistils. *Actin* gene was used as an internal control.

## 2.6 转基因植株的表型

本试验所用的野生型非洲紫罗兰 (图 5, A; 图 6, A) 花色为紫色, 花瓣呈辐射对称, 花从外向内依次由 4 轮花器官组成: 第 1 轮花萼一般为 5 枚或 6 枚; 第 2 轮花冠基部合生, 花瓣为 5 瓣或 6 瓣; 第 3 轮雄蕊与花瓣数相符, 其中部分发育不良; 第 4 轮 1 枚雌蕊。

转 *LjCYCI* 基因植株花结构受到不同程度的影响, 主要有以下几种表型变化: (1) 花的对称性明显改变, 由辐射对称变为两侧对称 (图 7, A ~ C), 出现频率为 14.3% (表 2); (2) 花瓣向花冠基部裂开, 且花瓣数减少 (图 7, D、E), 出现频率为 57.1%; (3) 部分或全部雄蕊花瓣化 (图 5, B ~ D), 出现频率为 17.1%; (4) 雌蕊花瓣化或退化 (图 5, C、D); (5) 部分花萼变成花瓣 (图 6, B), 出现频率为 7.1%; (6) 花萼数由野生型的 5 枚或 6 枚减少为 4 枚 (图 6, C), 出现频率为 7.1%。

在花 4 轮结构中表型变化最明显的是 2、3 轮, 其出现频率达到 70% 以上。这些变化表明 *LjCYCI* 影响了非洲紫罗兰花的表型, 使花 4 轮结构都有不同程度的改变。

表 2 *LjCYCI* 转化非洲紫罗兰花表型的变化

Table 2 The changes of floral phenotype in *LjCYCI* transformed *Saintpaulia ionantha*

新出现的表型 New phenotype	花数 Flower number	频率/% Percentage
两侧对称花 Zygomophy	10	14.3
花瓣深裂 Deep crack petals	40	57.1
雄蕊花瓣化 Petal-like stamen	12	17.1
雌蕊花瓣化或退化 Pistils were petal-like or degenerated	8	11.4
花萼花瓣化 Petal-like sepal	5	7.1
4 枚花萼 Four sepals	5	7.1

注: 盛花期时随机统计。

Note: Calculated at the full-bloom stage.

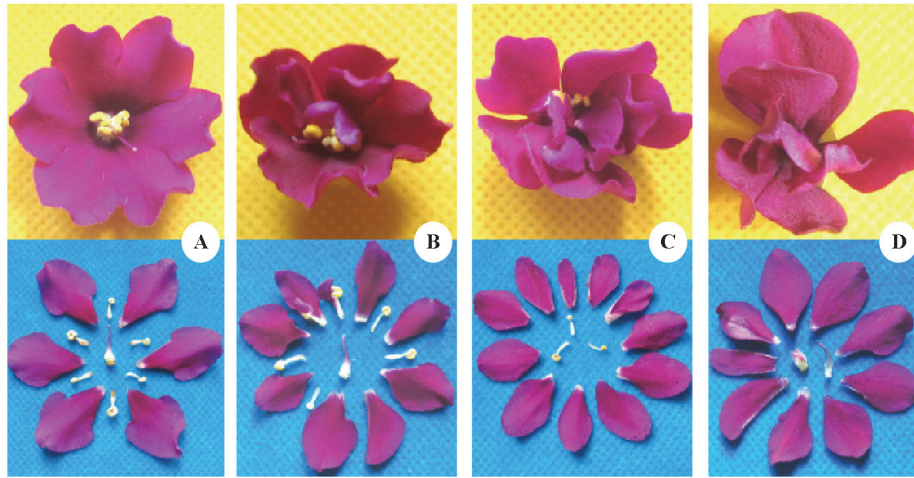


图5 *LjCYC1* 转化非洲紫罗兰雄蕊、雌蕊的变化

A: 正常野生型; B: 2枚雄蕊花瓣化; C: 3枚雄蕊、雌蕊花瓣化; D: 全部雄蕊花瓣化, 雌蕊退化, 且雄蕊位置形成1个花萼类似物。

Fig. 5 The change of stamens and pistils in *LjCYC1* transformed *Saintpaulia ionantha*

A: Normal wild type; B: Two stamens are petalized; C: 3 stamens and pistils are petalized; D: All stamens are petalized, and pistils are degenerated, and a sepal-like structure is formed at the stamen position.

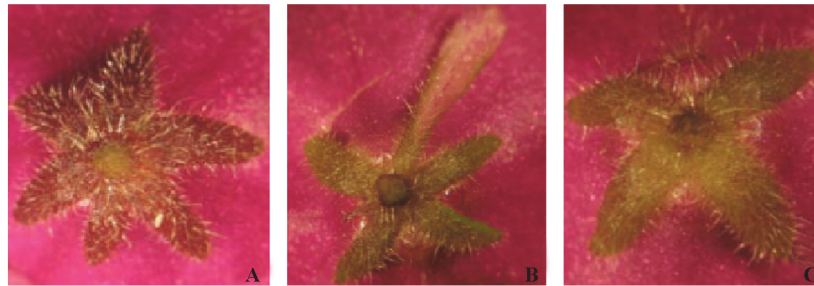


图6 *LjCYC1* 转化非洲紫罗兰萼片的变化

A: 野生型; B: 1枚花萼花瓣化; C: 花萼仅有4枚。

Fig. 6 The change of sepals in *LjCYC1* transformed *Saintpaulia ionantha*

A: The wild type; B: A sepal changed to petal; C: There were four sepals only.



图7 *LjCYC1* 转化非洲紫罗兰花对称性的变化

A: 1个深裂口, 花呈两侧对称; B: 1个深裂, 花呈两侧对称, 下部两个花瓣向百脉根龙骨瓣(腹瓣)形状转变; C: 两个深裂口, 花呈两侧对称; D、E: 多个裂口, 花呈不对称性, 且雄蕊退化(E)。

Fig. 7 The change of flower symmetry in *LjCYC1* transformed *Saintpaulia ionantha*

A: The corolla have a deep crack and appear bilateral symmetry; B: The corolla have a deep crack and appear bilateral symmetry, two petals in the below changed to ventral petal of *Lotus japonicus*; C: The flower has two deep cracks and appear bilateral symmetry; D, E: The flower has multi-deep cracks and appears asymmetry, and the stamens were degenerated.

### 3 讨论

Wang 等 (2010) 的研究结果表明, 百脉根 *LjCYC1* 和 *LjCYC2* 在控制背部花瓣发育中功能上是冗余的, *LjCYC3* 在侧瓣属性控制中起关键作用。Feng 等 (2006) 的研究结果表明在百脉根中组成型表达 *LjCYC2* 使所有的花瓣均呈现背部花瓣属性, 而该基因的突变体则表现为背部花瓣形状的改变及表皮细胞类型侧部化。在花生转 *LjCYC2* 基因的植株中观察到, 在  $T_1$  代转基因植株中大部分变异花的背部花瓣 (旗瓣) 形状有所改变, 有向内凹陷的趋势, 1.5% 的花表现为旗瓣消失; 在  $T_2$  代转基因植株中则所有的变异花都具有两个背部花瓣 (温世杰 等, 2015)。在烟草中转化正义 *LjCYC3* 植株表现为花瓣和雄蕊数减少; 而转化反义 *LjCYC3* 的植株表现为 2 朵花有一定程度的融合, 花冠、萼片褪色等现象 (张寒英 等, 2011)。兰花 *CgAGL6* 转化烟草, 转化植株的雄蕊出现花瓣化现象 (胡立霞 等, 2011)。

本研究中所用的表达载体由烟草花叶病毒 35S 启动子启动, 属于植株组成型启动子, 可以不受外界环境条件的影响调控基因表达, 几乎在所有植物的不同组织中都能表达。RT-PCR 检测结果显示, 外源 *LjCYC1* 在非洲紫罗兰的根、叶、花序梗、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊都高效表达, 也验证了这一点。在 *LjCYC1* 转化非洲紫罗兰的  $T_1$  代植株中观察到不同花型变异的花。这些花型的变异主要包括两种类型, 一是花对称性的改变, 由野生型的辐射对称花变为两侧对称花, 甚至出现有明显背腹之分的花; 二是花器官形态的改变, 如花瓣向花冠基部裂开, 雄蕊、雌蕊、花萼花瓣化。这些花型的变化可能是转基因共抑制所导致的, 即转入的 *LjCYC1* 可能抑制了非洲紫罗兰中内源的决定花对称性的 *CYC* 类基因 (如 *SiCYC1A* 和 *SiCYC1B*) 的表达, 使非洲紫罗兰的花由辐射对称变为两侧对称; 也可能通过改变非洲紫罗兰内源控制花器官属性基因 (如 B 类和 C 类基因) 的表达, 从而影响花器官的发育, 由于影响程度不同使得花器官形态的变异呈现多种表型。

本研究结果表明, 转入百脉根 *LjCYC1* 可以改变非洲紫罗兰花的对称性, 使雄蕊、雌蕊花瓣化, 这为培育两侧对称花或重瓣花的非洲紫罗兰新品种奠定了基础。

### References

- Aguilar-Martínez J A, Poza-Carrión C, Cubas P. 2007. *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell*, 19: 458 - 472.
- Busch A, Horn S, Muhlhausen A, Mummenhoff K. 2012. Corolla monosymmetry: evolution of a morphological novelty in the Brassicaceae family. *Mol Biol Evol*, 29 (4): 1241 - 1254.
- Busch A, Zachgo S. 2007. Control of corolla monosymmetry in the Brassicaceae *Iberis amara*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (42): 16714 - 16719.
- Du Z Y, Wang Y Z. 2008. Significance of RT-PCR expression patterns of *CYC-like* genes in *Oreocharis benthami* (Gesneriaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (1): 23 - 31.
- Endress P K. 2001. Evolution of floral symmetry. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (1): 86 - 91.
- Feng X Z, Zhao Z, Tian Z X, Xu S L, Luo Y H, Cai Z G, Wang Y M, Yang J, Wang Z, Weng L, Chen J H, Zheng L Y, Guo X Z, Luo J H, Sato S, Tabata S, Ma W, Cao X L, Hu X H, Sun C R, Luo D. 2006. Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicas*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (13): 4970 - 4975.
- Gao Q, Tao J H, Yan D, Wang Y Z, Li Z Y. 2008. Expression differentiation of *CYC-like* floral symmetry genes correlated with their protein sequence divergence in *Chirita heterotricha* (Gesneriaceae). *Dev Genes Evol*, 218 (7): 341 - 351.
- Green A A, Kennaway J R, Hanna A I, Bangham J A, Coen E. 2010. Genetic control of organ shape and tissue polarity. *PLoS Biol*, 8 (11): e1000537.
- Howarth D G, Donoghue M J. 2006. Phylogenetic analysis of the "ECE" (*CYC/TB1*) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proc*



- Natl Acad Sci USA, 103 (24): 9101 - 9106.
- Howarth D G, Martins T, Chimney E, Donoghue M J. 2011. Diversification of *CYCLOIDEA* expression in the evolution of bilateral flower symmetry in Caprifoliaceae and *Lonicera* (Dipsacales). *Ann Bot London*, 107 (9): 1521 - 1532.
- Hu Li-xia, Xu Jing, Pang Ji-liang, Wang Li-lin, Wang Hui-zhong, Yu Hong. 2011. Cloning and functional research of an *AGL6* homologous gene in hybrid of *Cymbidium goeringii* and *Cymbidium hybridum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 317 - 326. (in Chinese)
- 胡立霞, 徐京, 庞基良, 王利琳, 王慧中, 余红. 2011. 春兰 × 大花蕙兰杂种 *AGL6* 同源基因的克隆及其功能研究. *园艺学报*, 38 (2): 317 - 326.
- Huang Di, Sun Ming, Yuan Cun-quan, Cheng Tang-ren, Wang Jia, Zhang Qixiang. 2017. Isolation and functional analysis of *CYC2d* orthologous genes from several plants of the tribe Anthemideae. *Journal of Beijing Forestry University*, 39 (4): 63 - 71. (in Chinese)
- 黄笛, 孙明, 袁存权, 程堂仁, 王佳, 张启翔. 2017. 春黄菊族部分植物 *CYC2d* 同源基因的分离与功能初步分析. *北京林业大学学报*, 39 (4): 63 - 71.
- Luo D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Clark J, Coen E. 1999. Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell*, 99 (4): 367 - 376.
- Luo D, Carpenter R, Vincent C, Copsey L, Coen E. 1996. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, 383 (6603): 794 - 799.
- Mondragon-Palomino M, Theissen G. 2009. Why are orchid flowers so diverse? reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. *Ann Bot*, 104 (3): 583 - 594.
- Mondragon-Palomino M, Trontin C. 2011. High time for a roll call: gene duplication and phylogenetic relationships of TCP-like genes in monocots. *Ann Bot London*, 107 (9): 1533 - 1544.
- Narendra R, Mohandas S. 2003. Transformation of African violet (*Saintpaulia ionantha*) with glucanasechitinase genes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae Sinica*, 624: 471 - 478.
- Qin L J, Guo X Z, Feng X Z, Weng L, Yan J, Hu X H, Luo D. 2004. Cloning of *LjCYC1* gene and nuclear localization of LjCYC1 protein in *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30 (5): 523 - 532.
- Tähtiharju S, Rijpkema AS, Vetterli A, Albert V A, Teeri T H, Elomaa P. 2012. Evolution and diversification of the *CYC/TB1* gene family in Asteraceae—a comparative study in gerbera (Mutisieae) and sunflower (Heliantheae). *Mol Biol Evol*, 29 (4): 1155 - 1166.
- Wang J C, Wang Y M, Luo D. 2010. *LjCYC* genes constitute floral dorsoventral asymmetry in *Lotus japonicus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (11): 959 - 970.
- Wang L, Gao Q, Wang Y Z, Lin Q B. 2006. Isolation and sequence analysis of two *CYC*-like genes, *SiCYC1A* and *SiCYC1B*, from zygomorphic and actinomorphic cultivars of *Saintpaulia ionantha*. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 44 (4): 353 - 361.
- Wang Z, Luo Y H, Li X, Wang L P, Xu S L, Yang J, Weng L, Sato S, Tabata S, Ambrose M, Rameau C, Feng X Z, Hu X, Luo D. 2008. Genetic control of floral zygomorphy in pea (*Pisum sativum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (30): 10414 - 10419.
- Wen Shijie, Liu Haiyan, Hong Yanbin, Huang Xia, Liang Xuanqiang. 2015. Preliminary studies on transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with flower symmetry gene *LjCYC2* in *Lotus japonicus*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 36 (5): 883 - 887. (in Chinese)
- 温世杰, 刘海燕, 洪彦彬, 黄霞, 梁炫强. 2015. 转 *LjCYC2* 基因改变花生花瓣对称性的初步研究. *热带作物学报*, 36 (5): 883 - 887.
- Xu S L, Luo Y H, Cai Z G, Cao X L, Hu X H, Yang J, Luo D. 2013. Functional diversity of *CYCLOIDEA*-like *TCP* genes in the control of zygomorphic flower development in *Lotus japonicus*. *J Interg Plant Biol*, 55 (3): 221 - 231.
- Yuan Z, Gao S, Xue D W. 2009. RETARDED PALEA1 controls palea development and floral zygomorphy in rice. *Plant Physiol*, 149 (1): 235 - 244.
- Zhang Han-ying, Hu Jiang-qin, Xiang Tai-he, Liang Hai-man, Wang Li-lin. 2011. Study on transformation of tobacco plant with flower symmetry gene *LjCYC3* in *Lotus japonicus*. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)*, 37 (1): 13 - 21. (in Chinese)
- 张寒英, 胡江琴, 向太和, 梁海曼, 王利琳. 2011. 百脉根花对称性基因 *LjCYC3* 转化烟草的研究. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 37 (1): 13 - 21.