

砂梨 *CONSTANS* 基因的克隆及原核表达分析

张军霞, 李鼎立, 王 然, 刘成连, 原永兵, 马春晖

(青岛农业大学园艺学院, 青岛 266109)

摘要: 为了探索梨树植物的开花调控机制, 本研究以砂梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 叶片为材料, 采用同源序列克隆法, 进行了开花调控相关基因 *CONSTANS* 的克隆, 命名为 *PyCO*, GenBank 登录号为 KF246572。序列分析表明, 该基因包含一个 1023 bp 的开放阅读框, 编码 340 个氨基酸, 推测蛋白质分子量为 37.81 kD, 等电点为 5.95。*PyCO* 蛋白具有典型的植物 CO 家族的结构特征, 含有 2 个高度保守的 B-box 及 CCT 结构域。进化树分析表明, 该氨基酸序列与苹果的同源性接近 93%, 与碧桃、可可树、草莓等其他高等植物的 CO 类蛋白同源性也在 70% 以上。原核表达获得了具有较高表达水平的融合蛋白, 分子量约为 58.5 kD, 为进一步探索梨树开花调控机理奠定了基础。

关键词: 梨; *CONSTANS* 基因; 克隆; 序列分析; 原核表达

CONSTANS Gene Cloning from *Pyrus pyrifolia* Nakai and Its Prokaryotic Expression Analysis

ZHANG Jun-xia, LI Ding-li, WANG Ran, LIU Cheng-lian, YUAN Yong-bing, MA Chun-hui

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract: In order to explore the regulation mechanism of flowering, the flowering-related *CONSTANS* gene, designated as *PyCO* (GenBank accession number: KF246572), was isolated from *Pyrus pyrifolia* Nakai by homologous cloning strategy. Sequence analysis revealed that the full-length cDNA sequence of *PyCO* was 1023 bp and encoded 340 amino acids, molecular weight and isoelectric point of the protein was 37.81 kD and 5.95, respectively. The sequence of *PyCO* protein contained B-box and CCT domain which were the typical structure characteristics of CO family in plants. According to the phylogenetic analysis of CO genes, deduced amino acid of *PyCO* gene demonstrated high homology with *MdCO* (93%), and more than 70% homologous with that of *Prunus persica*, *Theobroma cacao*, and *Fragaria vesca*. In the end, the fusion protein was produced at a high level by prokaryotic expression and then 58.5 kD protein was obtained. This study would provide a foundation for further discussion of the flowering mechanism of pear.

Key words: pear; *CONSTANS*; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

梨是我国重要果树资源之一, 栽培历史悠久, 是重要的出口创汇果品^[1]。梨树实生苗童期较长, 从播种到开花结果一般需 4~8 年时间^[2-3], 这在一定程度上影响了梨树育种进程, 因此, 如何缩短梨树实生苗的童期, 对梨果生产具有十分重要的意义。

目前果树育种当中, 主要采用栽培措施、喷施植

物生长调节剂等方式来促进梨树的提前开花, 但效果均不理想, 植物基因工程技术的发展和开花基因调控机理的研究为缩短童期开辟了一个新方向。开花基因 *CONSTANS* (*CO*) 是光周期调控途径中的关键基因之一, 是目前植物开花研究热点基因之一^[4-9]。*CO* 基因的功能主要体现在长日照下可以将光信号转化为开花信号传递给 *Flowering locus T*

收稿日期: 2013-09-22 修回日期: 2013-10-22 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1413.008.html>

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2007D64); 国家现代农业 (梨) 产业技术体系建设专项 (Nyeytx-29-06)

第一作者研究方向为果树栽培生理与分子生物学。E-mail: zhangjunxiabeijing@163.com

通信作者: 马春晖, 主要从事果树栽培生理研究。E-mail: machunhui2000@163.com

(FT)基因,从而促进 *SOC1* 基因 mRNA 积累使植物开花^[10-16],研究同时还发现 *CO* 基因转录的 mRNA 呈渐进方式积累,当达到一定域值时,可显著地促进基因 *TFL*、*LFY* 表达,加速花的发育^[17]。*CO* 基因是影响植物开花早晚的重要因子之一,且在植物开花控制途径上具有保守性。拟南芥 *CO* 基因功能研究表明,*CO* 基因的过量表达促进了植株开花提前^[18];同时一些异源 *CO* 基因,如牵牛花 *PnCO* 基因和萝卜 *BnCO* 基因,转入拟南芥 *co* 突变体中,可以使 *co* 突变体长日照开花延迟的现象恢复到正常表型^[19-20]。现在 *CO* 基因已经在多种植物中得到克隆,且基因序列及包含的锌指结构域和核定位信号区域有很高的同源性,这为本研究进行同源序列克隆提供了帮助。

CO 基因在植物开花调控中具有重要作用,但在梨属植物中未见相关报道,故为探讨 *CO* 基因在梨树开花中的作用,本研究利用同源序列克隆法进行了砂梨 *CO* 基因全长 cDNA 序列的分离,对其结构特征进行分析,并构建原核表达质粒,在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达,期望为探索梨 CO 蛋白的生化功能和开花调控机理奠定基础,同时为缩短梨树童期提供了候选基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料采自青岛农业大学胶州梨种质资源圃‘黄金梨’(*Pyrus pyrifolia* Nakai)叶片。液氮冷冻,−80℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 砂梨 *CONSTANS* 基因的克隆和序列分析 引物设计参考 GenBank 中苹果(AAC99310)、桃(ACH73166)、可可树(EOY29267)、草莓(XP004291989)和棉花(ADW65758)的保守序列进行设计,设计软件为 Primer Premier 5.0,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其中正向引物:5'-ATTACATTGCAGCAGATTTC-3',反向引物:5'-CGACCGATATTTACACCCAC-3'。PCR 反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经切胶纯化回收后连接 pTZ57R/T 载体,转化大肠杆菌 DH5α,序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

砂梨总 RNA 的提取参考宝生物工程(大连)公司 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal

RNA Extraction Kit 说明书进行;cDNA 合成及反应体系参考 Fermentas 公司反转录试剂盒 RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。

1.2.2 砂梨 *CONSTANS* 基因原核表达载体构建及表达 根据已克隆砂梨 *CONSTANS* 基因的 cDNA 全长,设计引物并添加酶切位点,正向引物:5'-CCG-GAATTC(*Eco*RI酶切位点)ATGGCATCGAAGCTCT-GCG-3'和反向引物:5'-CCGCTCGAG(*Xho*I酶切位点)CTAAACGACGGACGACGC-3'。用 *Eco*RI和 *Xho*I分别双酶切回收提纯的 PCR 扩增产物和 pET-32a(+)载体骨架,经 T4 DNA 连接酶连接后转化至 DH5α 菌株中,阳性克隆提取质粒后由 PCR 和双酶切检测,该重组质粒命名为 pET32a(+)-*PyCO*,并将其转化至 BL21(DE3)菌株。

阳性克隆经培养后,按 1:100 的比例接种到新鲜的 LB 培养基中,以空质粒、重组质粒不加 IPTG 为对照,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.10 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 诱导 0 h、4 h 和 8 h。期间离心并收集菌液,每次取 1 mL 菌液,4000 r/min 离心收集菌体,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 10 min 以裂解细胞,冷水迅速冷却至室温,4℃放置,进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色。

1.2.3 砂梨 *CONSTANS* 基因生物信息学分析方法 根据测得的基因序列,由 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析 *PyCO* 的开放读码框;序列相似性分析由 Blast 软件分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);采用 Conserved Domains(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行保守结构域分析;多序列比对工具为 DNAMAN 软件;采用 MEGA 5.0 软件进行系统发育树的构建;通过 ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)、CBS 和 NPS 服务器上的 ProtParam、PROSITE、TM-HMM、SignalP 4.1、GOR 4 等程序对砂梨 *CONSTANS* 基因进行理化性质和序列结构的分析。本研究中所有氨基酸序列均来自 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)。

2 结果与分析

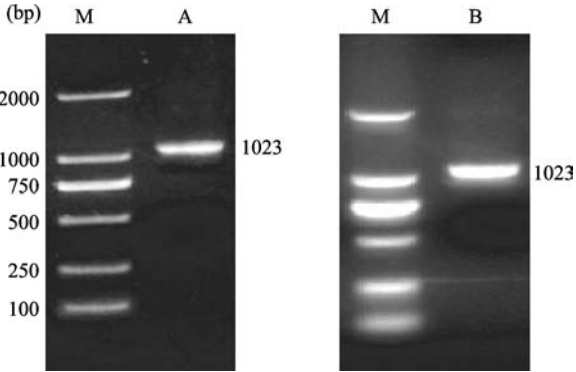
2.1 砂梨 *CONSTANS* 基因的克隆与氨基酸序列结构分析

以砂梨叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行扩增获得 *CONSTANS* 基因 cDNA 片段为 1023 bp

(图 1),编码 340 个氨基酸(图 2)。经 ORF Finder 和 Blast 分析,命名为 *PyCO*, GenBank 登录号为 KF246572。

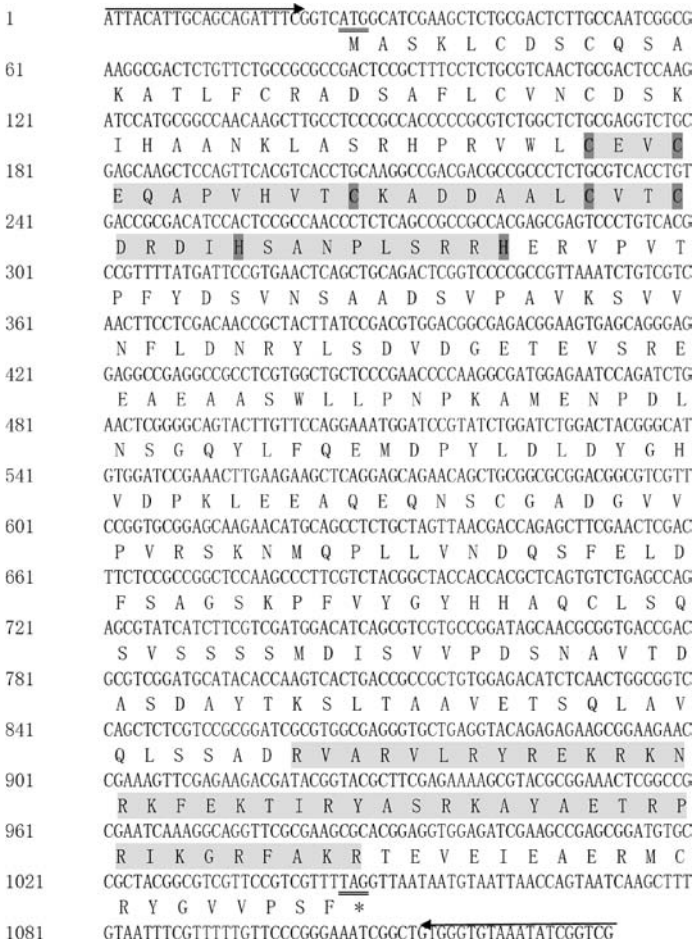
用 NCBI 上的 Conserved Domains 程序预测该蛋白质的保守区域,发现砂梨 *PyCO* 基因的氨基酸序列具有典型的植物 CO 家族结构特点,有 2 个高度保守的 B-box 及 CCT 结构域,是典型的锌指结构(图 3),表明 *PyCO* 属于植物 CO 蛋白质家族的一员,可能对砂梨开花调控有着重要作用。

用 ProtParam 预测蛋白理化性质,结果表明,*PyCO* 蛋白等电点为 5.95,相对分子质量为 37.81 kD,蛋白分子式为 C₁₆₃₄ H₂₅₈₀ N₄₇₄ O₅₂₁ S₁₉,总原子数为 5228。负电荷残基(Asp + Glu):47,正电荷残基(Arg + Lys):42,该蛋白 N 末端为 Met,半衰期为 30 h,不稳定系数为 43.84,是不稳定蛋白。脂溶指数为 72.59,总平均疏水性为 -0.444,推测为疏水性脂溶蛋白。



M:DL2000 DNA ladder;A:RT-PCR 扩增结果;
B:菌液 PCR 检测结果
M:DL2000 DNA ladder,B:RT-PCR amplification result,
C:Detection results of PCR amplification

图 1 砂梨 *CONSTANS* 基因的 RT-PCR 扩增结果和菌液 PCR 检测结果
Fig. 1 The results of RT-PCR and PCR amplification of *Pyrus pyrifolia* *CONSTANS* gene



双下划线表示起始密码子和终止密码子; * 表示翻译终止; 箭头所示为扩增所用引物位置及扩增方向; 阴影部分表示锌指结构和 CCT 结构域
Double underline denotes the initiation codon and the termination codon. The asterisk denotes the translation termination. The arrowhead means the primers used and the amplification direction. The gray region means the B-box domain and the CCT domain

图 2 砂梨 *CO* 基因的 cDNA 序列及氨基酸序列
Fig. 2 cDNA and amino acid sequence analysis of *PyCO* gene of *Pyrus pyrifolia*



图 3 砂梨 PyCO 蛋白的保守域分析

Fig. 3 Putative conserved domains analysis of PyCO protein

用 ProtScale 程序详细分析了该蛋白的亲水性和疏水性,基于氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强的规律,结果显示 PyCO 中疏水性区域所占比例远比亲水性区域大。在 289 位 Lys 具有最低的分值 -3.789,亲水性最强;多肽链第 111 位 Val 具有最高的分值 1.422,由此可以推测 PyCO 蛋白为疏水性蛋白,这与 ProtParam 预测结果一致。

利用 TM-HMM 2.0 方法对 PyCO 蛋白进行跨膜结构预测,膜内蛋白所占比例在 0.1% 以下,结果表明梨 *CO* 基因该蛋白不存在跨膜结构域,整条肽链均位于细胞膜外,因此断定这个蛋白为膜外蛋白。经 Signal 4.1 分析,该氨基酸序列无信号肽结构,属于非分泌型蛋白。通过 NPS 服务器上的 GOR 4 程序对其二级结构进行分析,发现该蛋白主要是由 α 螺旋和无规则卷曲组成,其中 α 螺旋、延伸主链和无规则卷曲的含量分别占 29.41 %、15.59%、和 55.00%。

2.2 PyCO 的同源序列比对及系统发育树构建

将推导的 PyCO 氨基酸序列在 GenBank 上进行 Blast 检索,结果显示砂梨与其他植物序列的高度相似性(图 4),其中与苹果 *CO* 类蛋白的相似性最高,为 93%;与桃、可可树、草莓、棉花、黄瓜及芒果等的同源性也都在 70% 以上。利用 MEGA 软件,对 GenBank 数据库中已登录的 17 种高等植物的 *CO* 蛋白氨基酸构建系统发育树(图 5),结果显示砂梨 *CO* 基因与苹果、桃的亲缘关系最近,其次是草莓、芒果、可可树、棉花、黄瓜,与水稻和烟草等亲缘关系较远,该结果与植物学分类存在一定的相关性。

2.3 PyCO 蛋白的原核表达

以经过测序的质粒为模板,采用添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切位点的引物扩增到一条约 1.2 kb 的片段,与引物设计结果相符,PCR 纯化产物经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切回收后,连接至 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的原核表达载体 pET-32a(+),获得原核表达质

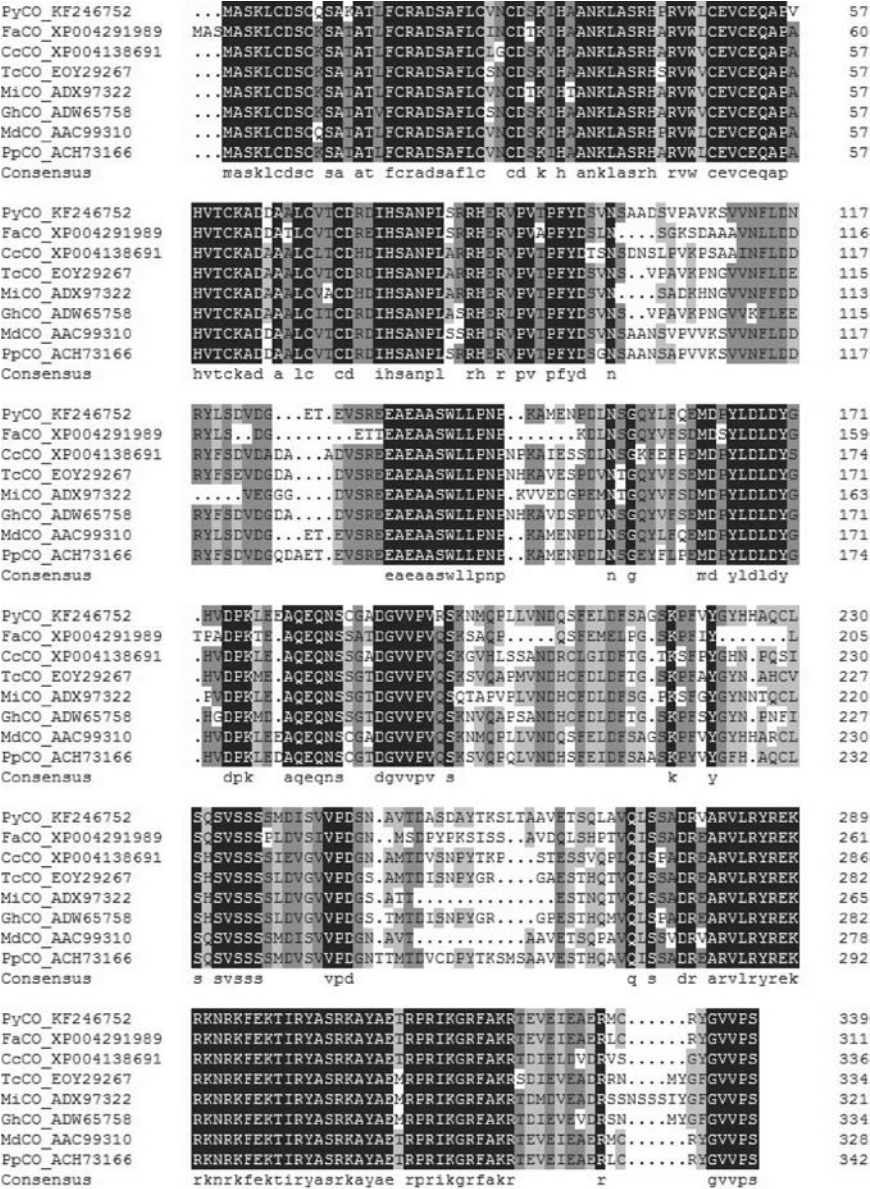
粒 pET-32a(+)-*PyCO*,经 PCR 扩增、双酶切鉴定(图 6)及测序证明重组质粒构建正确。

重组质粒 pET-32a(+)-*PyCO* 转化 BL21 (DE3)大肠杆菌,SDS-PAGE 电泳检测结果(图 7)表明,经 IPTG 诱导,重组质粒 pET-32a(+)-*PyCO* 在 44.3 ~ 66.4 kD 处有一个明显的蛋白条带,而空质粒、加 IPTG 诱导的空质粒和未加 IPTG 诱导的重组质粒的菌株均未出现目的蛋白条带,但在不同的诱导时间上(0 h、4 h、8 h),目标条带的深度变化不明显,表达量基本一致。

3 讨论

梨树为多年生植物,童期长,梨树经过童期进入生殖阶段,受复杂基因调控网络控制。*CO* 基因是植物光周期促进开花途径中一个重要的成花转变调控基因,是连接生物钟和花分生组织决定基因的桥梁^[21],在植物光周期开花调控当中起关键作用。目前先后在拟南芥、烟草、苹果、水稻^[22]等多种植物中克隆获得 *CO* 同源基因,但在梨属植物中尚未见 *CO* 基因的相关报道。本研究从砂梨叶片中克隆获得了 *CO* 基因的全长 cDNA 序列,并进行了原核表达,这将为砂梨 *CO* 基因工程研究,改善和缩短梨属植物童期相关研究奠定基础。

植物开花调控网络相互影响,共同决定植物开花,如拟南芥的开花受到春化作用和光周期相互作用的影响。*CO* 基因是植物开花调控的关键基因之一,可以整合光信号和生物钟信号调控下游基因而影响植物开花。*CO* 基因家族之间同源性较差,但在 CCT 基序和 B-box 型锌指结构处高度保守。其表现为:(1)含有 2 个外显子和 1 个内含子;(2)含有 B-box1、B-box2、CCT 结构域及 COOH 区域 4 个高度保守的区域。研究显示,B-box1 和 B-box2 结构域和许多动物蛋白中的 B-box 结构域极为相似,主要结合环状锌指结构、NHL 结构、螺旋结构或 RFP 结构域,具有调解蛋白之间相互作用的功能^[23-24]。



PyCO (KF246752) : 砂梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ; FaCO (XP004291989) : 草莓 (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*) ; CcCO (XP004138691) : 黄瓜 (*Cucumis sativus*) ; TeCO (EOY29267) : 可可树 (*Theobroma cacao*) ; MiCO (ADX97322) : 芒果 (*Mangifera indica*) ; GhCO (ADW65758) : 棉花 (*Gossypium hirsutum*) ; MdCO (AAC99310) : 苹果 (*Malus domestica*) ; PpCO (ACH73166) : 桃 (*Prunus persica*)

图 4 不同植物 CONSTANS 氨基酸序列同源比对

Fig. 4 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of CONSTANS from different plants

对已知的 7 个典型的 *co* 突变体进行分析发现,这些突变全部发生在锌指结构区域或 CCT 区域,因此证明这 2 个区域对 *CO* 基因的功能非常重要^[25]。一些异源 *CO* 基因转入拟南芥 *co* 突变体中,可以使其恢复到正常表型,而作为 *CO* 的直接靶基因 *FT* 基因已经在多种植物中克隆获得,说明 *CO* 基因在控制植物开花中的途径与功能是保守的,只是由于其他因子的调控作用,导致产生不同的开花习性^[19-20,26]。本研究中已克隆的砂梨 *PyCO* 基因和其他植物相似度较高,且具有植物 *CO* 家族的典型特征,含有与蛋

白作用相关的 B-box 和与核定位有关的 CCT 两类重要的保守结构域,推测 *PyCO* 基因属于 *CO* 家族的一员,为功能蛋白,可能对砂梨开花调控有着重要作用。*PyCO* 基因预测氨基酸与苹果、桃和草莓的同源性分别为 93%、87% 和 73%,表明 *CO* 基因编码蛋白间的相似性基本上反映了这些物种间的亲缘关系^[19]。基因的表达是其功能实现的基础,表达模式的变化是植物进化的动力^[27]。A. Samach 等^[27] 通过外部同步模型指出:当 *CO* 蛋白表达高峰与光照同

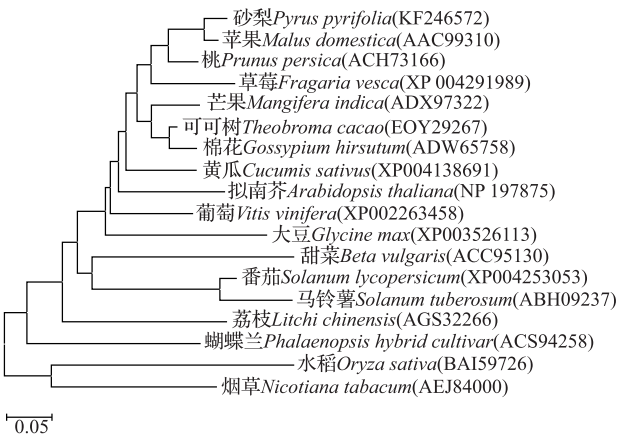
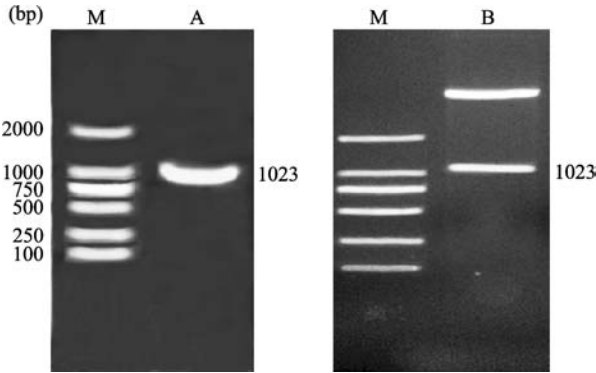


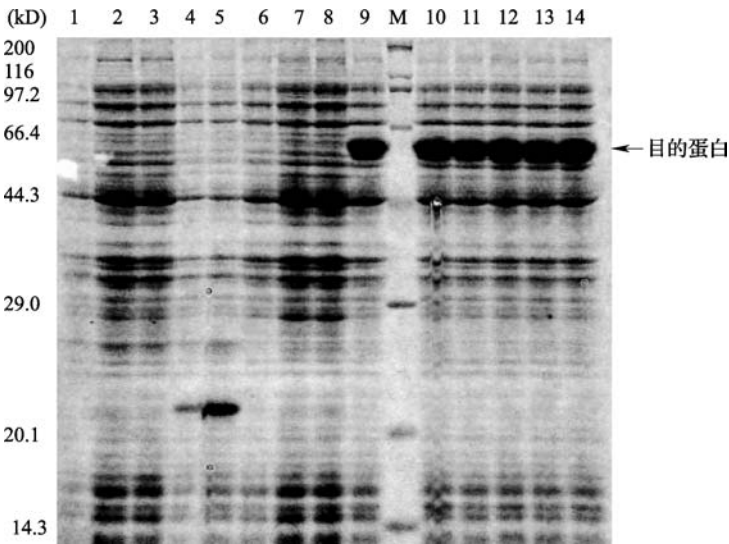
图 5 不同植物 *CONSTANS* 氨基酸序列系统发育树分析
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino acid sequences of plant *CONSTANS* protein

步时才能激活拟南芥的光感知和一系列成花基因,如 *FT*、*SOC1* 和 *LFY* 的表达^[28],从而促进植物的开花。迄今为止,虽然已经分离克隆出了许多 *CO* 基



M;DL2000 DNA 相对分子量标准;A;PCR 结果;
B;pET-32a(+) - *PyCO* 重组质粒 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切
M;DL2000 DNA ladder,A;PCR analysis,B;pET-32a(+) - *PyCO* recombinant plasmid digested with *EcoR*I and *Xho*I
图 6 pET-32a(+) - *PyCO* 重组质粒双酶切和 PCR 验证结果

Fig. 6 Restriction enzyme digestion and PCR analysis of pET-32a(+) - *PyCO* recombinant plasmid



M:蛋白质相对分子量标准;1~3:无 IPTG 的 pET-32a(+) 分别诱导 0 h、4 h、8 h
4~5:用 0.1 mmol/L IPTG 分别诱导 4 h、8 h 的 pET-32a(+) ;6~8:无 IPTG 的 pET-32a(+) - *PyCO* 分别诱导 0 h、4 h、8 h
9、11、13:用 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 分别诱导 4 h 的 pET-32a(+) - *PyCO*
10、12、14:用 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 分别诱导 8 h 的 pET-32a(+) - *PyCO*
M:Protein molecular weight marker,1-3:Induced without IPTG of pET-32a(+) for 0 h,4 h, and 8 h
4-5:Induced with 0.1 mmol/L IPTG of pET-32a(+) for 4 h,8 h,6-8:Induced without IPTG of pET-32a(+) - *PyCO* for 0 h,4 h, and 8 h
9,11, and 13:Induced with 0.1 mmol/L,0.5 mmol/L, and 1 mmol/L IPTG of pET-32a(+) - *PyCO* for 4 h
10,12, and 14:Induced with 0.1 mmol/L,0.5 mmol/L,1 mmol/L IPTG of pET-32a(+) - *PyCO* IPTG for 8 h

图 7 *PyCO* 融合蛋白在大肠杆菌中的 SDS-PAGE 诱导表达分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant *PyCO* protein in *E. coli*

因,但绝大多数 *CO* 基因的体外表达研究还比较少。而了解该基因在植物体内的生化功能,必须从蛋白质水平上进行研究。原核表达系统为研究 *CO* 蛋白

的表达和功能提供了一条有效的途径。本研究将砂梨 *CO* 蛋白基因与原核表达载体 pET-32a(+) 重组,转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导融合蛋白表

达,SDS-PAGE 鉴定表明已经获得包含有 PyCO 主要功能区域的融合蛋白,并在原核表达体系正确表达。由于其主要功能区域的高度保守,因此可以利用这一蛋白进行纯化,制作抗体,为进一步研究 CO 蛋白的功能提供依据,也可为后续的转基因研究奠定基础。

参考文献

- [1] 赵纪伟,李莉,彭建营,等. 梨不同品种花粉生活力测定及授粉特性研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(1):152-156,162
- [2] 沈德绪,李载龙,郑淑群,等. 梨杂种实生苗前生长量与童期相关问题的研究[J]. 园艺学报,1982(9):27-32
- [3] 沈德绪,李载龙,郑淑群. 梨早实性遗传的研究[J]. 遗传学报,1978(5):220-225
- [4] Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, et al. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Nature*,2001,410:1116-1120
- [5] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice[J]. *Plant J*,2003,36(1):82-93
- [6] Holefors A, Opseth L, Rosnes A K R, et al. Identification of *PaCOL1* and *PaCO2*, two *CONSTANS-like* genes showing decreased transcript levels preceding short day induced growth cessation in Norway spruce [J]. *Plant Physiol*, 2009, 47(2):105-115
- [7] Almada R, Cabrera N, Casaretto J A, et al. *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds [J]. *Plant Cell Rep*, 2009,28(8):1193-1203
- [8] Hassidim M, Harir Y, Yakir E, et al. Over-expression of *CONSTANS-LIKE5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis* [J]. *Planta*,2009,230(3):481-491
- [9] Kim S Y, Yu X H, Michaels S D. Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUST* expression in response to changing light quality [J]. *Plant Physiol*,2008,148(1):269-279
- [10] Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, et al. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice [J]. *Nature*, 2003,422:719-722
- [11] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F G, et al. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis* [J]. *Science*,2005,309:293-297
- [12] Kobayashi Y, Weigel D. Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiodic-dependent flowering [J]. *Genes Dev*,2007,21:2371-2384
- [13] Takase T, Yasuhara M, Geekiyanage S, et al. Over-expression of the chimeric gene of the floral regulator *CONSTANS* and the EAR motif repressor causes late flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*,2007,26:815-821
- [14] Imaizumi T, Kay S A. Photoperiodic control of flowering; not only by coincidence [J]. *Trends Plant Sci*,2006,11(11):550-558
- [15] Jang S, Marchal V, Panigrahi K C, et al. *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response [J]. *EMBO J*,2008,27:1277-1288
- [16] 彭凌涛. 控制拟南芥和水稻开花时间光周期途径的分子机制 [J]. 植物生物学讯,2006,42(6):1021-1031
- [17] Simon R, Igeño M I, Coupland G. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis* [J]. *Nature*,1996,384:59-62
- [18] Putterill J, Robson F, Lee K. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Cell*,1995,80(6):847-857
- [19] Liu J, Yu J, McIntosh L, et al. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering [J]. *Plant Physiol*, 2001,125(4):1821-1830
- [20] Robert L S, Robson F, Sharpe A, et al. Conserved structure and function of the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS* in *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Biol*,1998,37(5):763-772
- [21] 樊丽娜,邓海华,齐永文. 植物 CO 基因研究进展 [J]. 西北植物学报,2008,28(6):1281-1287
- [22] Kim S K, Yun C H, Lee J H, et al. *OsCO3*, a *CONSTANS-like* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT-like* genes under SD conditions in rice [J]. *Planta*,2008,228:355-365
- [23] Borden K L B. Ring domains: master builders of molecular scaffolds [J]. *J Mol Biol*,2000,295:1103-1112
- [24] Torok M, Etkin L D. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins [J]. *Differentiation*, 2001, 67:63-71
- [25] Robson F, Costa M M, Hepworth S R, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants [J]. *Plant J*,2001,28(6):619-631
- [26] Yasue N, Mayumi K, Takuichi F, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice [J]. *Plant J*,2003,36(1):82-93
- [27] Samach A, Onouchi H, Gold S E, et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis* [J]. *Science*,2000,288(5471):1613-1616
- [28] 郭于龙,闫明旭,陈君,等. 矮牵牛 *PMADS9* 基因启动子的克隆及分析 [J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):275-280