

金线莲 *ArCRC* 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析

林江波, 邹晖, 黄惠明, 李和平, 戴艺民*

(福建省农业科学院亚热带农业研究所, 福建 漳州 363005)

摘要: 为了解金线莲(*Anoectochilus roxburghii*) YABBY 基因家族的 CRABS CLAW (CRC)亚族基因在花和叶片发育中的功能, 基于金线莲全长转录组数据 RT-PCR 克隆 *ArCRC* 基因, 对其编码蛋白进行生物信息学、原核表达、亚细胞定位分析, 采用 qPCR 技术对基因的表达模式进行分析。结果表明, 金线莲 *ArCRC* 基因 CDS 长度为 576 bp (GenBank 登录号: OR394646), 编码 191 个氨基酸, 含有 YABBY superfamily 和 HMG-box_SF superfamily 保守结构域, 分子量为 21.514 kD, 理论等电点为 9.16, 不稳定系数 41.12, 属于不稳定蛋白。系统进化分析表明, *ArCRC* 与水稻(*Oryza sativa*)的 OsDL 和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 AtCRC 聚为一类, 属于 CRC 亚家族, 且定位在细胞核。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 结果表明, *ArCRC* 基因可在大肠杆菌中成功诱导表达。qRT-PCR 分析表明, *ArCRC* 基因在花的表达量最高, 其次是叶, 且在叶片中脉的表达量显著高于叶片外缘, 因此, 推测 *ArCRC* 基因主要在花器官发育中发挥功能, 同时还参与调控叶片中脉的发育。

关键词: 金线莲; *ArCRC* 基因; 转录因子; 基因克隆; 亚细胞定位; 基因表达分析

doi: 10.11926/jtsb.4858

CSTR:32235.14.jtsb.4858

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *ArCRC* Gene in *Anoectochilus roxburghii*

LIN Jiangbo, ZOU Hui, HUANG Huiming, LI Heping, DAI Yimin*

(Fujian Academy of Agricultural Sciences, Subtropical Agriculture Research Institute, Zhangzhou 363005, Fujian, China)

Abstract: To understand the function of CRABS CLAW (CRC) subgene of the YABBY gene family of *Anoectochilus roxburghii* in flower and leaf development, the *ArCRC* gene was cloned by RT-PCR based on the full-length transcriptome data of *A. roxburghii*. The bioinformatics, prokaryotic expression and subcellular localization of encoded *ArCRC* protein were analyzed, and the expression pattern of *ArCRC* gene was analyzed by qPCR. The results showed that the CDS length of *ArCRC* gene was 576 bp (GenBank accession No.: OR394646), coding 191 amino acids. *ArCRC* contains YABBY superfamily and HMG-box_SF superfamily conserved domain, with molecular weight 21.514 kD, theoretical isoelectric point 9.16, instability coefficient 41.12, belonging to the unstable protein. Phylogenetic analysis showed that *ArCRC* was clustered with OsDL of rice (*Oryza sativa*) and AtCRC of *Arabidopsis thaliana*, belonging to the CRC subfamily and localized in the nucleus. SDS-PAGE electrophoresis and Western blot results showed that *ArCRC* gene could be successfully induced in *Escherichia coli*. qRT-PCR analysis showed that the expression of *ArCRC* gene was the highest in flowers, followed by leaves, and the expression in the midrib of leaves was significantly higher than that in the margin of leaves. Therefore, it was speculated that *ArCRC* gene mainly played a role in the development of flower organs and was also involved in regulating the development of the midrib of leaves.

收稿日期: 2023-10-19 接受日期: 2023-12-12

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2021R1030001); 福建省农业科学院科技创新团队(CXTD2021001-2)资助

This work was supported by the Project for Basic Research of Public Research Institute in Fujian (Grant No. 2021R1030001), the Project for Science and Technology Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No. CXTD2021001-2)

作者简介: 林江波(1976年生), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: 345953257@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dyntcn@163.com

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; *ArCRC* gene; Transcription factor; Gene cloning; Subcellular localization; Gene expression analysis

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)是兰科(Orchidaceae)开唇兰属植物,其主要活性成分有金线莲苷^[1]、黄酮^[2]、多糖^[3]等,具有降血糖^[4]、保肝^[5]和抑制肿瘤^[6]等功效,是福建道地中药材。金线莲对生境条件要求苛刻且胚发育不全,须与菌根真菌共生,才能萌发,种子自然条件下萌发率低,野生资源濒临灭绝。虽然,近年来经过科研工作者的努力,金线莲在组织培养和人工栽培的关键技术上取得重大突破^[7-8],但是,长期的无性繁殖,也造成了金线莲品质的退化,因此,开展金线莲有性杂交育种研究已经迫在眉睫。花器官是植物有性繁殖器官,有关金线莲花器官发育已有少量的研究报道。邢丙聪等^[9]筛选了 23 条金线莲的 *WRKY* 转录因子,其中 *ArWRKY5* 和 *ArWRKY20* 基因在叶芽期、花芽期和开花期的花中表达量都显著高于根、茎、叶,可能具有调控花发育的功能。陈育青等^[10-12]利用电子显微镜观察了金线莲花药发育过程的形态、钙离子、多糖和脂滴的分布特征。

YABBY 家族转录因子是一类植物特有转录因子,在植物生长、发育和形态发生中发挥重要作用,包含有 N 端 C2C2 锌指结构域和 C 端类似 HMG 框的螺旋-环-螺旋的 *YABBY* 结构域^[13]。目前已经从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[14]、水稻(*Oryza sativa*)^[15]、荷花(*Nelumbo nucifera*)^[16]、人参(*Panax ginseng*)^[17]、小桐子(*Jatropha curcas*)^[18]、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)^[19]、毛果杨(*Populus trichocarpa*)^[20]等作物中分别鉴定出 6、8、9、16、7、11、12 个 *YABBY* 基因。双子叶植物 *YABBY* 基因家族被分为 *CRABS CLAW* (*CRC*)、*FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*)/*YABBY3* (*YAB3*)、*INNER NO OUTER* (*INO*)、*YABBY2* (*YAB2*)和 *YABBY5* (*YAB5*)等 5 个亚家族,单子叶植物被分为 4 个亚家族,缺少 *YAB5* 亚家族^[21]。

CRC 亚家族基因与心皮发育、蜜腺形成、花分生组织终止、果实发育和叶片中脉形成有关,同源基因在不同作物间存在功能差异。豌豆(*Pisum sativum*)的 *PsCRC* 基因调控心皮的融合、蜜腺的发育^[22]。玉米(*Zea mays*)的 *drl1* 和 *drl2* 是花分生组织决定和花器官发育所必需的^[23]。黄瓜(*Cucumis sativus*)的 *CsCRC*^G 通过转录激活 *CsARF1*,从而增强细胞扩增,正向调节果实伸长^[24]。目前,未见金

线莲 *CRC* 基因的相关研究报道。

鉴于 *CRC* 亚家族基因在植物花器官、果实和叶片发育过程发挥重要作用,本研究在前期福建种源金线莲全长转录组测序的基础上,筛选克隆了 1 条 *CRC* 基因的 CDS 序列,并开展生物信息学分析、亚细胞定位以及不同器官表达分析,以期为进一步验证基因功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为福建种源金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)种植苗,种植于福建省农业科学院亚热带农业研究所温室大棚;亚细胞定位材料为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。

1.2 *ArCRC* 基因的克隆

取开花期金线莲健康植株,分别取根、茎、叶、花、叶中脉和叶外缘组织,液氮速冻后-70℃保存。利用湖南艾科瑞生物工程有限公司的 *SteadyPure* 植物 RNA 提取试剂盒(货号:AG21019)和 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒(货号:AG11706)提取总 RNA 和合成单链 cDNA。

根据金线莲全长转录组数据获得的基因序列,设计扩增全长 CDS 引物 *ArABBY-F* 和 *ArABBY-R* (表 1)。以根、茎、叶和花混合的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件为:94℃预变性 30 s;98℃变性 10 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,35 个循环;72℃延伸 2 min。胶回收目的条带,连接载体 pMD18T,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,阳性克隆进行测序。测序结果用 DNAMAN V6 比对,提取比对正确克隆的质粒,命名为 18T-*ArCRC*。

1.3 *ArCRC* 生物信息学分析

利用 Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线搜索和预测蛋白的保守结构域和理化性质。用 MEGA 6.0 软件^[25]构建系统进化树(Neighbor-Joining Tree, Bootstrap 1000)。

1.4 *ArCRC* 亚细胞定位分析

ArCRC 亚细胞定位分析委托北京启迪利泰科技有限公司完成。构建 pSuper1300-35S-*ArCRC*-GFP

表 1 引物

Table 1 Primer

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	功能 Function
ArABBY-F	GGATCCATGGAGCTGGGCTCTCCATT	CDS 克隆
ArABBY-R	CTCGAGCTTGTCATTCCATGCGATGCT	
bby-F	CCAAGCCAGACATTCTCAC	qPCR
bby-R	ACTTGAGACCGCTACTGTTGG	
ArACT1	AGATGAGGCACAGTCCAAGA	qPCR
ArACT2	GCTGGAACATTGAAGGTCTC	

重组质粒并转化农杆菌 GV3101, 与含有 pCAMBIA 1300-35S-Histone-mcherry 质粒(细胞核定位蛋白)的农杆菌 GV3101 以 1:1 体积比混合, 选取生长状态良好的烟草, 放于白色荧光灯下 1 h, 选择倒 3 和倒 4 叶片下表面注射, 暗培养 48 h 后激光共聚焦显微镜(Lecia sp8, 德国)下观察叶片, 并捕捉荧光信号获取图像。

1.5 原核表达与融合蛋白的 Western blot 检测

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切质粒 18T-*ArCRC* 和 pGEX-4T-1, 经胶回收、连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取阳性克隆质粒, 获得重组原核表达质粒 pGEX-4T-*ArCRC*。将 pGEX-4T-*ArCRC* 转化大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3), 诱导表达参照林江波等^[26]的方法, 蛋白分子量标准使用翌圣生物科技(上海)股份有限公司的三色预染蛋白质分子量标准(10~180 kD) (货号: 20351ES72)。Western blot 检测参考教杨等^[27]的方法, 一抗和二抗分别为鼠抗 GST 单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

1.6 *ArCRC* 基因表达分析

用 Primer Premier 5.0 软件设计 *ArCRC* 基因引物 bby-F 和 bby-R, 产物长度 110 bp, 以 Actin 作为内参基因^[28], 引物为 ArACT1 和 ArACT2。以金线莲的根、茎、叶、花、叶中脉和叶外缘的第 1 链 cDNA 作为模板, 荧光定量 PCR 试剂盒为湖南艾科瑞生物工程有限公司的 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒(货号: AG11701), 具体操作参照林江波等^[29]方法进行, 仪器为 Roche LightCycler 96。以

茎的表达量作为参考因子, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *ArCRC* 基因克隆与编码蛋白理化性质分析

以金线莲根、茎、叶和花混合的 cDNA 为模板, 利用引物 ArABBY-F 和 ArABBY-R 进行 PCR 扩增, 获得 1 条约 580 bp 的特异性条带(图 1)。目的条带测序结果表明克隆到 *ArCRC* 基因的开放阅读框, 长度为 576 bp (GenBank 登录号 OR394646), 编码 191 个氨基酸。ProtParam 预测 *ArCRC* 蛋白的分子量为 21.514 kD, 理论等电点为 9.16, 不稳定系数 41.12, 属于不稳定蛋白。

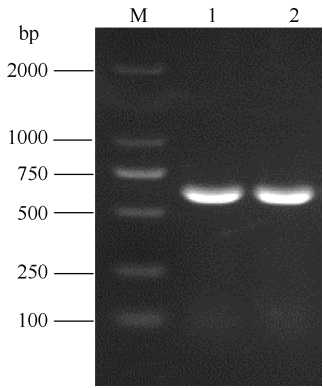


图 1 PCR 电泳结果。M: DNA marker 2000; 1, 2: *ArCRC* 基因全长 CDS。

Fig. 1 PCR products by electrophoresis. M: DNA marker 2000; 1 and 2: CDS of *ArCRC*.

2.2 *ArCRC* 蛋白结构预测及系统进化分析

Protein BLAST 在线搜索比对, *ArCRC* 蛋白在 5~144 氨基酸具有 YABBY superfamily 保守结构域, E-value 为 1.06×10^{-56} , 在 107~150 氨基酸含有 HMG-box_SF superfamily 保守结构域, E-value 为 4.74×10^{-4} (图 2)。

把金线莲 *ArCRC* 蛋白与 8 个水稻和 6 个拟南芥的 YABBY 蛋白进行聚类分析, 结果表明(图 3),

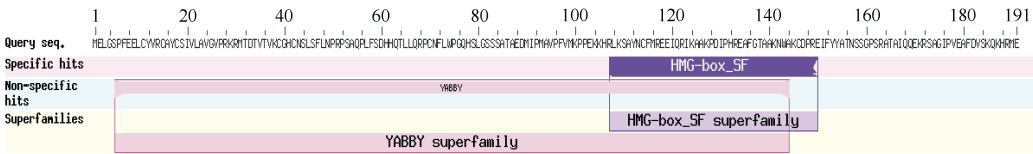


图 2 *ArCRC* 蛋白保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of *ArCRC* protein

ArCRC 与水稻的 *OsDL* 和拟南芥的 *AtCRC* 聚为一类, 亲缘关系最近, 属于 *CRC* 亚家族, 因此将基因命名为 *ArCRC*。

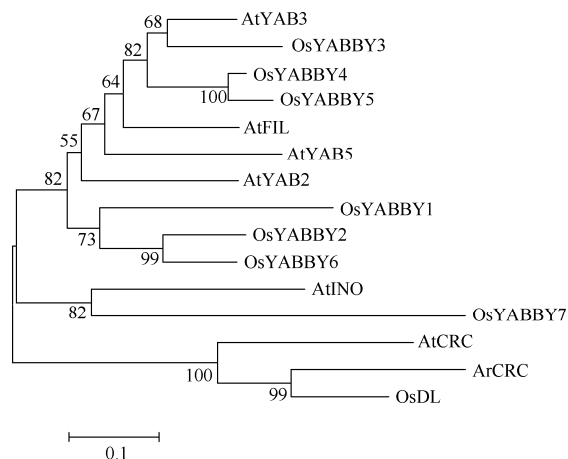


图 3 *ArCRC* 与水稻和拟南芥 YABBY 蛋白聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of *ArCRC* and YABBY proteins in rice and *Arabidopsis*

2.3 *ArCRC* 蛋白亚细胞定位分析

将 *ArCRC* 蛋白与植物细胞核定位 Marker 在烟草叶片中共定位, 通过激光共聚焦扫描显微镜观

察, *ArCRC* 与植物细胞核定位 Marker 定位一致(图 4), 说明 *ArCRC* 定位于细胞核。

2.4 *ArCRC* 的原核表达与 Western Blot

将转化了 pGEX-4T-*ArCRC* 的大肠杆菌 BL21 (DE3), 37 °C 诱导表达 3 h 后进行 SDS PAGE 分析蛋白表达。GST 蛋白分子量为 26 kD, *ArCRC* 蛋白分子量为 21.514 kD, pGEX-4T-*ArCRC* 融合蛋白分子量为 47.514 kD。从图 5 可见, 与诱导前相比, 诱导后的 *E. coli* 菌液出现 1 条约 47.514 kD 的差异条带。蛋白表达产物用 GST 标签的单克隆抗体进行 Western blot 检测, 诱导表达的蛋白与 GST 单克隆抗体在 47.514 kD 处有明显的杂交条带, 未诱导的无条带, 结果说明 *ArCRC* 基因被成功诱导表达。

2.5 *ArCRC* 基因的表达分析

利用 qRT-PCR 检测 *ArCRC* 基因的表达模式, 结果表明(图 6), *ArCRC* 基因在金线莲的根、茎、叶和花中都能检测到表达, 花的表达量最高, 其次是叶, 分别是茎表达量的 301.29 和 57.88 倍, 达极显著差异; 花的表达量是叶片的 5.21 倍, 达极显著差异; 茎和根的表达量很低, 差异不显著。*ArCRC* 基因在叶片中脉的表达量显著高于叶片外缘。

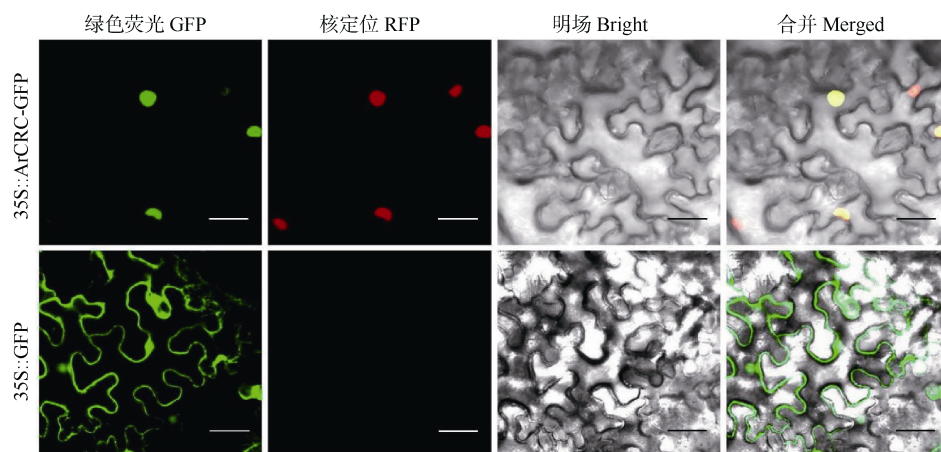


图 4 *ArCRC* 蛋白在烟草叶片下表皮细胞中的亚细胞定位。标尺=25 μ m

Fig. 4 Subcellular localization of *ArCRC* protein in lower epidermal cells of tobacco leaves. Bars=25 μ m

3 讨论和结论

YABBY 基因家族是高等植物特有的一类转录因子, 主要参与调控植物花器官和叶片发育, *CRC* 是其中的一类亚家族。拟南芥 *AtCRC* 基因是心皮和蜜腺发育的主要决定因素, *CRC* 功能缺失导致心皮未融合、蜜腺缺失^[13,30]。水稻 *DL* (*DROOPING LEAF*)

基因与拟南芥 *CRC* 是同源异型基因, 主要和水稻叶片中脉的形成和花的发育相关, 水稻 *DL* 基因功能缺失突变, 心皮同源转化为雄蕊, 叶片中脉缺失^[31-32]。本研究从金线莲中克隆了 *ArCRC* 基因编码区序列, 编码的氨基酸序列含有 *YABBY* superfamily 和 HMG-box_SF superfamily 保守结构域, 属于不稳定蛋白, 本氏烟草瞬时表达确定 *ArCRC* 定位

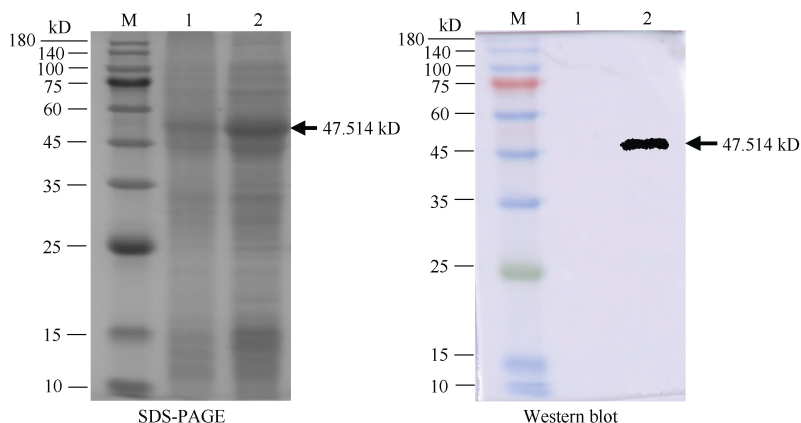


图 5 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测。M: Marker (10~180 kD); 1: 诱导前; 2: 诱导后。

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis and western blot detection. M: Marker (10~180 kD); 1: Pre-induction; 2: After induction.

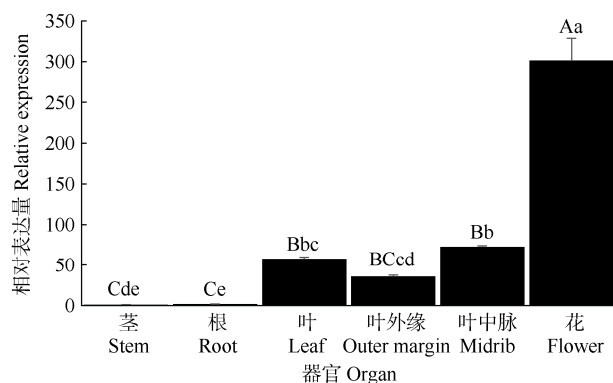


图 6 *ArCRC* 基因在金线莲器官中的相对表达量。柱上不同大、小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Relative expression of *ArCRC* in organs of *Anoectochilus roxburghii*. Different capital and small letters upon column indicated significant difference at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

于细胞核。将重组原核表达质粒 pGEX-4T-*ArCRC* 导入大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达后, Western blot 进一步验证, 获得与预测大小一致的 GST-*ArCRC* 融合表达蛋白, 说明 *ArCRC* 基因可以在大肠杆菌中正确表达。序列进化分析表明 *ArCRC* 与水稻的 OsDL 和拟南芥的 AtCRC 聚为一类, 属于 CRC 亚家族。推测 *ArCRC* 与水稻的 OsDL 和拟南芥的 AtCRC 具有相似的功能。

CRC 基因在植物中的表达具有组织特异性。番茄 *SICRCa* 基因在花瓣和雄蕊中高度表达, 响应赤霉素处理, 通过影响细胞分裂和细胞扩张来负调控果实和花器官大小^[33]。小桐子 *JcCRC* 基因仅在花器官中检测到表达^[18]。巴西橡胶树 *HbCRC1* 基因在叶片中高表达, 且在叶片发育过程呈略微上调趋势, *HbCRC2* 基因在雌花中高表达, 在叶片中不表

达^[19]。水稻 *DL* 基因在叶原基的中心区域和心皮原基表达, 促进叶片中脉的形成和心皮的发育^[32]。为了预测金线莲 *ArCRC* 基因在金线莲生长发育过程中潜在的功能, 本研究利用荧光定量 PCR 分析了 *ArCRC* 基因在不同器官中的表达水平, *ArCRC* 基因在花中表达量最高, 其次是叶片, 且叶中脉表达量显著高于外缘, 花的表达量是叶片的 5.21 倍, 推测金线莲 *ArCRC* 基因在金线莲器官发育中发挥功能, 同时还参与调控叶片中脉的形成。

综上, 从金线莲中克隆出 YABBY 家族转录因子 CRC 亚家族的 *ArCRC* 基因, 编码 191 个氨基酸。金线莲 *ArCRC* 基因含有 YABBY superfamily 和 HMG-box_SF superfamily 保守结构域, 属于 YABBY 家族的 CRC 亚家族。*ArCRC* 是细胞核定位的转录因子, 在金线莲花和叶中脉高表达, 表明 *ArCRC* 可能在金线莲花发育和叶中脉形成中发挥重要功能。

参考文献

- [1] CHEN Y, WANG W Y, CHEN S N, et al. Changes in kinsenoside content of different strains of *Anoectochilus roxburghii* at different growth periods [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(8): 1423–1429. [陈莹, 王文义, 谌赛男, 等. 不同品系及生长期金线莲的金线莲苷含量变化研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(8): 1423–1429. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20200911001.]
- [2] XUE M H, LU S K, WENG W, et al. Effects of planting methods on the content of flavonoids in *Anoectochilus roxburghii* [J]. Fujian Anal Test, 2021, 30(1): 33–36. [薛梅花, 卢石孔, 翁文, 等. 不同种植方式对金线莲黄酮类化合物含量的影响 [J]. 福建分析测试, 2021, 30(1): 33–36. doi: 10.3969/j.issn.1009-8143.2021.01.07.]
- [3] CHEN C L, LI W L, AN X, et al. Effects of light intensities on poly-

- saccharide and flavonoid contents in *Anoectochenia roxburghii* [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(15): 5103–5109. [陈常理, 李文略, 安霞, 等. 光照强度对金线莲多糖和黄酮类物质含量的影响 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(15): 5103–5109. doi: 10.13271/j.mpb.021.005103.]
- [4] TANG F, ZHANG X Q, XU J T, et al. Screening on hypoglycemic effective part of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2011, 42(2): 340–342. [唐菲, 张小琼, 徐江涛, 等. 金线莲降血糖活性部位的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 340–342.]
- [5] ZHANG X Y, YU X L, YE H H. Research progress on hepatoprotective effect and mechanism of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. [J]. Mod Chin Med, 2022, 24(5): 920–925. [张晓颖, 俞晓玲, 叶寒辉. 金线莲保肝作用及作用机制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(5): 920–925. doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210223004.]
- [6] LÜ J G, ZHANG H, ZHOU H H, et al. Effects of kinsenoside on the proliferation, migration and invasion of human hepatoma HepG2 cells [J]. J Hubei Univ Sci Technol (Med Sci), 2022, 36(1): 5–8. [吕建国, 张晗, 周荟慧, 等. 金线莲苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2022, 36(1): 5–8. doi: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2022.01.005.]
- [7] XU S S, LI Y Q, FENG H M, et al. Study on the formulation optimization technology of ‘Hongxia’ *Anoectochilus roxburghii* tissue culture medium [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2021, 27(24): 15–17. [徐双双, 李怡清, 冯慧敏, 等. ‘红霞’金线莲组培培养基配方优化技术研究 [J]. 安徽农学通报, 2021, 27(24): 15–17. doi: 10.3969/j.issn.1007-7731.2021.24.005.]
- [8] SHI M R, LUO Y F. Study on the establishment and optimization of the sterile system of wild *Anoectochilus roxburghii* from eastern Fujian Province [J]. J Anhui Agric Sci, 2022, 50(7): 96–98. [施满容, 罗义发. 闽东野生金线莲无菌体系建立与优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(7): 96–98. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.07.022.]
- [9] XING B C, SU L Y, WAN S Q, et al. Screening and cloning analysis of WRKY transcription factor regulating embryo development from *Anoectochilus roxburghii* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2022, 53(12): 3745–3754. [邢丙聪, 苏立样, 万思琦, 等. 金线莲中调控胚胎发育 WRKY 转录因子筛选及克隆分析 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3745–3754. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.021.]
- [10] CHEN Y Q, LI Q J, LAI Z X, et al. Characteristics of calcium distribution in the developing anthers of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2021, 41(6): 977–983. [陈育青, 李秋静, 赖钟雄, 等. 金线莲花药发育中的钙离子分布特征 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(6): 977–983. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2021.06.0977.]
- [11] CHEN Y Q, HUANG Z H, LI Q J, et al. Microstructure of anther development of *Anoectochilus roxburghii* [J]. J Chin Elect Microsc Soc, 2021, 40(4): 425–431. [陈育青, 黄泽豪, 李秋静, 等. 福建濒危药用植物金线莲花药发育的形态观察 [J]. 电子显微学报, 2021, 40(4): 425–431. doi: 10.3969/j.issn.1000-6281.2021.04.011.]
- [12] CHEN Y Q, LIN H Q, LIN M Z, et al. Distribution characteristics of polysaccharides and lipids in the developing anther of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin, 2020, 40(8): 1333–1338. [陈育青, 林汉钦, 林美珍, 等. 金线莲花药发育中多糖和脂滴的分布特征 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(8): 1333–1338. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2020.08.1333.]
- [13] BOWMAN J L, SMYTH D R. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains [J]. Development, 1999, 126(11): 2387–2396. doi: 10.1242/dev.126.11.2387.
- [14] SIEGFRIED K R, ESHED Y, BAUM S F, et al. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis* [J]. Development, 1999, 126(18): 4117–4128. doi: 10.1242/dev.126.18.4117.
- [15] DONG H, LI Y X, WANG T K, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *YABBY* gene family in rice [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(15): 4845–4854. [董皓, 李懿星, 王天抗, 等. 水稻 *YABBY* 家族的全基因组鉴定与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(15): 4845–4854. doi: 10.13271/j.mpb.018.004845.]
- [16] XU Y, QIAO Z L, ZHAO L, et al. Genome-wide and transcriptome analysis of *YABBY* family gene in Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J]. Mol Plant Breed, 2022, 20(22): 7342–7353. [徐逸, 譙正林, 赵琳, 等. 荷花 *YABBY* 家族的全基因组和转录组分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(22): 7342–7353. doi: 10.13271/j.mpb.020.007342.]
- [17] LIU X B, WANG S J, SUN J Y, et al. Identification and expression analysis of *YABBY* gene family in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. J Chin Med Mat, 2021, 44(12): 2970–2975. [刘秀波, 王思嘉, 孙嘉莹, 等. 人参中 *YABBY* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 中药材, 2021, 44(12): 2970–2975. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.12.044.]
- [18] ZHANG Z S, GONG M, WU D D, et al. Genome-wide characterization, expression profiles and alternative splicing events of *YABBY* family genes in *Jatropha curcas* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2023, 31(2): 249–262. [张作胜, 龚明, 吴丹丹, 等. 小桐子 *YABBY* 全基因组家族成员的鉴定、表达和可变剪接分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2023, 31(2): 249–262. doi: 10.11926/jtsb.4570.]
- [19] ZHANG H T, XIAO X H, YANG J H, et al. Identification and expression analysis of *YABBY* gene family in *Hevea brasiliensis* [J]. Chin J Trop Crops, 2022, 43(11): 2188–2198. [张鸿韬, 肖小虎, 阳江华, 等. 巴西橡胶树 *YABBY* 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 热带作物学报, 2022, 43(11): 2188–2198. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2022.11.002.]
- [20] MIAO J Q, HUANG Y, NING R, et al. Bioinformatics analyses on

- YABBY* gene family in *Populus trichocarpa* [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(10): 3245–3252. [苗嘉琪, 黄颖, 宁蕊, 等. 毛果杨 *YABBY* 基因家族生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(10): 3245–3252. doi: 10.13271/j.mpb.021.003245.]
- [21] ZHANG X Y, LIU X. Research progress of transcription factors and leaf development [J]. Plant Physiol J, 2022, 58(1): 91–100. [张雪莹, 刘欣. 转录因子与叶片发育的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2022, 58(1): 91–100. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2021.0253.]
- [22] FOURQUIN C, PRIMO A, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ I, et al. The *CRC* orthologue from *Pisum sativum* shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development [J]. Ann Bot, 2014, 114(7): 1535–1544. doi: 10.1093/aob/mcu129.
- [23] STRABLE J, VOLLBRECHT E. Maize *YABBY* genes drooping leaf1 and drooping leaf2 regulate floret development and floral meristem determinacy [J]. Development, 2019, 146(6): dev171181. doi: 10.1242/dev.171181.
- [24] CHE G, PAN Y P, LIU X F, et al. Natural variation in *CRABS CLAW* contributes to fruit length divergence in cucumber [J]. Plant Cell, 2023, 35(2): 738–755. doi: 10.1093/plcell/koac335.
- [25] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- [26] LIN J B, WANG W Y, LI H M, et al. Cloning and expression analysis of *NtPLATZ1* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. J NW A&F Univ (Nat Sci), 2016, 44(10): 165–170. [林江波, 王伟英, 李海明, 等. 中国水仙锌指蛋白 *NtPLATZ1* 的克隆与表达分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 165–170. doi: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.10.023.]
- [27] JIAO Y, QU M, GUI B B, et al. Prokaryotic expression and western blot identification of *FUT10* protein in *Crassostrea gigas* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(8): 2573–2579. [教杨, 曲梦, 桂彬彬, 等. 太平洋牡蛎中类 *FUT10* 蛋白的原核表达及免疫印迹鉴定 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2573–2579. doi: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.08.023.]
- [28] LIN J B, WANG W Y, ZOU H, et al. Expression stabilities of three housekeeping genes of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Fujian J Agric Sci, 2018, 33(11): 1125–1129. [林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 金线莲 3 个持家基因表达稳定性分析 [J]. 福建农业学报, 2018, 33(11): 1125–1129. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2018.11.001.]
- [29] LIN J B, ZOU H, WANG W Y, et al. Cloning and expressions of *LIS* in *Dendrobium officinale* [J]. Fujian J Agric Sci, 2020, 35(10): 1071–1077. [林江波, 邹晖, 王伟英, 等. 铁皮石斛 *DoLIS* 基因克隆与茉莉酸甲酯诱导表达分析 [J]. 福建农业学报, 2020, 35(10): 1071–1077. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2020.10.004.]
- [30] LEE J Y, BAUM S F, OH S H, et al. Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade [J]. Development, 2005, 132(22): 5021–5032. doi: 10.1242/dev.02067.
- [31] YAMAGUCHI T, NAGASAWA N, KAWASAKI S, et al. The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa* [J]. Plant Cell, 2004, 16(2): 500–509. doi: 10.1105/tpc.018044.
- [32] OHMORI Y, TORIBA T, NAKAMURA H, et al. Temporal and spatial regulation of *DROOPING LEAF* gene expression that promotes midrib formation in rice [J]. Plant J, 2011, 65(1): 77–86. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04404.x.
- [33] YANG T W, HE Y, NIU S B, et al. A *YABBY* gene *CRABS CLAW a (CRCa)* negatively regulates flower and fruit sizes in tomato [J]. Plant Sci, 2022, 320: 111285. doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111285.