

DAP-seq 和 RNA-seq 揭示转录因子 APETALA3-3 调控铁皮石斛花型变化机理

宋雅蓉, 朱洪凤, 敖 叠, 刘安祺, 陆德银, 和凤美*

云南农业大学园林园艺学院, 云南昆明 650201

摘 要: 兰花唇瓣是特化的花瓣, 因其多样性具有极大观赏价值和生物学价值, 但其形成机理迄今仍未解决。APETALA3-3 (AP3-3) 是花器官身份基因, 与兰花唇瓣形成有关, 但其如何调控兰花唇瓣多样性形成机理目前未见报道。本研究以铁皮石斛野生型植株和铁皮石斛 DoAP3-3 过表达植株的花器官为研究对象, 通过 DAP-seq 和 RNA-seq 联合分析, 从铁皮石斛转录因子 DoAP3-3 调控下游靶基因的角度探讨唇瓣多样性形成机制。结果表明: 共鉴定出 MADS6、NAC029、NAC054、WOX3、AS2、ERECTA、AG 等 7 个关键候选靶基因, 这些靶基因可能通过特异性调控或在 DoAP3-3 的作用下与其他基因互作调控花器官发育和花型发育。酵母单杂交实验验证表明转录因子 DoAP3-3 与 MADS6 之间存在相互作用, 影响花型发育。该研究为初步解析花器官特征基因 DoAP3-3 与其靶基因之间的调控机制, 探究兰科植物中高度特化和多样化的花形态形成机理奠定基础。

关键词: APETALA3-3; 铁皮石斛; DNA 亲和纯化测序; DAP-seq; 转录组测序; 花型发育

中图分类号: S682.31

文献标志码: A

Mechanism of Transcription Factor APETALA3-3 Regulating Floral Morphogenesis in *Dendrobium officinale* Based on DAP-Seq and RNA-seq Analysis

SONG Yarong, ZHU Hongfeng, AO Die, LIU Anqi, LU Deyin, HE Fengmei*

College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

Abstract: The diversity of orchid labellum, a specialized petal, has great ornamental and biological value, but the formation mechanism has not been solved so far. APETALA3-3 (AP3-3) is a floral organ identity gene, which is related to the formation of orchid labellum, but there is no report on how it regulating the formation mechanism of orchid labellum diversity. In this project, wild type and DoAP3-3 overexpressing floral organs of *Dendrobium officinale* were used as the research objects to explore the formation mechanism from the perspective of transcription factor DoAP3-3 regulating downstream target genes through DAP-seq and RNA-seq joint analysis. The results showed that a total of 7 key candidate target genes, MADS6, NAC029, NAC054, WOX3, AS2, ERECTA, AG were identified, which may regulate floral organ development and floral morphogenesis development under the action of DoAP3-3 by specific regulation or interaction with other genes. The interaction between transcription factor DoAP3-3 and MADS6 was verified by yeast one-hybrid experiment, which further affecting floral morphogenesis development. This study would lay a foundation for preliminary analysis of the regulatory mechanism between DoAP3-3 and its target genes, and exploring the formation mechanism of highly specialized and diversified flower morphology in Orchidaceae.

Keywords: APETALA3-3; *Dendrobium officinale*; DNA affinity purification sequencing; DAP-seq; RNA-seq; flower morphologies development

收稿日期 2024-12-26; 接受日期 2025-02-06

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32260419); 云南省教育厅项目 (No. A3032024393)。

作者简介 宋雅蓉 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 花卉植物分子遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 和凤美 (HE Fengmei), E-mail: hefengmei918@126.com。

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.004

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 是兰科最大属之一, 兼具观赏价值和药用价值, 也是四大观赏兰花属之一。目前学者们已掌握了铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 瓶内开花技术及遗传转化技术, 可在分子层面对其花器官特异性进行研究, 因此铁皮石斛是研究花器官发育的极好模型。

已有研究表明 *MADS-box* 基因作为植物花器官的发生发育与形态构造的关键转录因子, 可通过复杂的网络在花器官发育不同阶段形成复杂复合物来调控花器官的发育, 因而成为花器官研究最广泛的基因家族^[1-2]。经典的“ABC”模型在模式植物拟南芥和金鱼草花器官突变体的研究中被提出^[3-4], 随着矮牵牛和拟南芥中 D 类基因^[5-6]及 E 类基因^[7-8]的发现和鉴定, 进一步将花发育模型扩展到“ABCDE”模型, 即 A+E 共同控制萼片的形成, A+B+E 共同控制花瓣的形成, B+C+E 调控雄蕊的形成, C+E 调控心皮的形成, D+E 调控胚珠的形成。除“ABCDE 模型”^[9]外, “兰花编码”^[10-11]、“Homeotic Orchid Tepal”模型^[12]和“花被 (P) 编码”^[13]模型被广泛认为是解释兰花花被器官身份特征的假说。

APETALA3-3 (*AP3-3*) 是 *MADS-box* 基因家族中 B 类基因^[14-15]。有研究表明在耬斗菜和黑种草中沉默 *AP3-3* 基因, 仅导致其花瓣向萼片的同源异型转变^[16], 已有研究鉴定和预测了毛茛科多个物种中花瓣特征基因 *AP3-3* 的下游靶基因^[17]。兰科植物的唇瓣是特化的花瓣, 是兰科植物独有的特异性器官, 也是兰科植物的主要观赏器官和昆虫传粉器官, 而 *AP3-3* 已被证明是兰花唇瓣发育的主要转录因子, 但目前 *AP3-3* 在兰科植物中的研究较少。因此研究 *AP3-3* 在兰花中参与唇瓣多样性形成的差异表达调控机理, 不仅能揭示唇瓣的起源与进化等机制, 还为遗传操作改变花型、培育兰花新品种和兰花的保育等方面奠定基础, 在观赏园艺和资源保护等领域具有更加广阔的应用前景。

DNA 亲和纯化测序 (DNA affinity purification sequencing, DAP-seq) 分析作为目前新开发的一种体外检测 TF-DNA (transcription factor, TF) 互作的分析方法, 成功将体内结合实验转移到体外, 极大地提高了 DNA 结合位点发现的效率, 可以高通量精确定位植物体内基因组中转录因子的

结合位点^[18-20]。转录组测序 (RNA-seq) 技术被用于研究基因表达、调控和育种新基因的挖掘^[21-22]。利用转录组与 DAP-seq 共同研究转录因子-靶基因的调控网络关系, 鉴定铁皮石斛转录因子 DoAP3-3 下游靶基因, 能够精准地挖掘出对表型具有显著贡献的核心基因。

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛野生型植株 (WT) 和铁皮石斛 *DoAP3-3* 过表达植株 (OE) 来自于本实验室前期研究。铁皮石斛新鲜叶片采自云南省林业和草原科学院石斛种植基地。

1.2 方法

1.2.1 DNA 亲和纯化测序 提取铁皮石斛叶片 DNA, 并将其片段化, 用磁珠筛选目标片段后利用建库试剂盒 (NEXTflex Rapid DNA-Seq Ki) 构建文库; 构建转录因子 DoAP3-3 的 halo-tag 体外表达质粒, 利用麦胚系统进行蛋白表达。将纯化后的转录因子 DoAP3-3 和亲和标签融合蛋白与基因组 DNA 文库共同孵育, 用 Halo Tag 特异性磁珠, 将目的蛋白和 DNA 复合物进行提取和纯化, 进行 PCR 扩增, 用 Qubit™ dsDNA-HS Assay Kit 检测 DNA 文库质量, 测序由武汉爱基百客生物科技有限公司完成。

1.2.2 DAP-seq 测序数据分析 使用 Fastqc (version: 0.11.5) 软件对原始数据质控处理, 使用 Trimmomatic (version: 0.36) 软件进行数据过滤, 使用 BWA (version: 0.7.15-r1140) 软件将 clean reads 数据比对到 *Dendrobium catenatum* (GCF_001605985.2) 参考基因组上, 利用 MACS (version: 2.1.1.20160309) 软件在基因组范围内检测转录因子 DoAP3-3 相对于对照所富集的峰, 筛选显著性富集的峰, 筛选阈值为 q value < 0.001 且 Fold Change 大于 2。对 peak 关联的基因进行 GO 及 KEGG 分析。利用 Homer、MEME、MEME-ChIP 软件分析转录因子 DoAP3-3 靶标基因富集 motif。利用 IGV 软件对结合峰进行可视化分析, 红色峰为重复 1, 蓝色峰为重复 2, 绿色峰为阴性对照 (input)。每个基因的外显子-内含子结构和方向 (箭头) 显示在面板的底部。红色箭头表示靶基因 TSS 上下 2000 bp 范围内结合情况。[0-50]代表

结合的强度,通过峰的高度来反映。

1.2.3 转录组测序 对铁皮石斛野生型植株 (WT) 和铁皮石斛 *DoAP3-3* 过表达植株 (OE) 分别提取不同时期 (从花芽到完全开放) 混合样花蕾 RNA, 利用 Illumina 高通量测序平台进行 RNA 测序, 测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

1.2.4 转录组测序数据分析 使用 Fastqc 对测序得到的 raw data 进行过滤, 利用 Hisat 将过滤得到的 clean reads 与参考基因组 *Dendrobium catenatum* (GCF_001605985.2) 进行序列比对。用 DEGseq 软件对铁皮石斛 *DoAP3-3* 过表达植株和 WT 植株测序结果进行基因表达量差异分析, 以 Fold Change ≥ 2 且 FDR < 0.01 筛选差异表达基因。将获得的差异基因与 NR、eggNOG、GO、KEGG、Swissprot 和 Pfam 等六大公共数据库进行比对, 获得在各数据库的注释信息, 筛选花器官发育相关差异表达基因。

1.2.5 启动子顺式作用元件生物信息学分析 利用植物顺式作用元件数据库 Plant CARE 对关键候选靶基因启动子序列的顺式作用元件进行预测分析, 用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.2.6 酵母单杂交互作实验 以铁皮石斛 *DoAP3-3* 过表达植株的 cDNA 为模板, 扩增 *DoAP3-3* 编码序列, 连接到 pGADT7 载体 (Clontech, USA) 中, 得到 pGADT7-*DoAP3-3*, 作为猎物。以铁皮石斛 *MADS6* 基因 DNA 为模板, 扩增目的基因启动子的特异性 DNA 序列, 克隆到 pHIS2 载体 (Clontech, USA) 中, 得到 pHIS2-*MADS6*, 作为诱饵。将构建到 pHIS2 载体上的 *MADS6* 基因及构建到 pGADT7 的 *DoAP3-3* 基因, 通过共转的方法转化至酵母菌株 Y187。分别从转化反应的平板上随机挑取 3 个单菌落, OD₆₀₀=0.002, 稀释 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2}) 点板至对应的不添加 histidine, 但添加不同浓度 (0、2.5、5、10、20、30、40、50、75、100 mmol/L) HIS3 蛋白竞争性抑制剂 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) 的缺陷型平板上, 30 °C 恒温培养 3 d, 筛选合适浓度, 消除自激活现象。将实验组 (pHIS2-*MADS6*+pGADT7-*DoAP3-3*)、阴性对照组 (pHIS2-*MADS6*+pGADT7)、阳性对照组 (pGAD53m+pHIS2-p53) 验证成功的单菌落, 用 2 mL 的 ddH₂O 水重悬, OD₆₀₀=0.002, 浓度设置为 3 个梯度 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} , 吸取 10 μ L 分别点板到 SD-TL(-trp, -leu)、SD-TLH

(-trp, -leu, -his)、SD-TLH+40 mmol/L 3AT 培养基上 (参照 Clontech 公司的 PT3024-1/Yeast Protocols Handbook), 每个板点 3 个点, 30 °C 恒温培养 3~5 d。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛野生型植株和 *DoAP3-3* 过表达植株花器官形态比较分析

铁皮石斛野生型植株和 *DoAP3-3* 过表达植株花型差异如图 1 所示, 其花型差异只表现在花瓣和萼片分布以及唇瓣的大小和颜色上, 其他形态无明显变化。过表达花朵的 2 片花瓣逆时针旋转大于 90°, 与萼片几乎重叠, 花瓣和萼片或镶嵌或融合; 过表达花朵的唇瓣较大, 且唇瓣腹部近轴凸起消失较为平展, 远轴处紫色斑点消失。



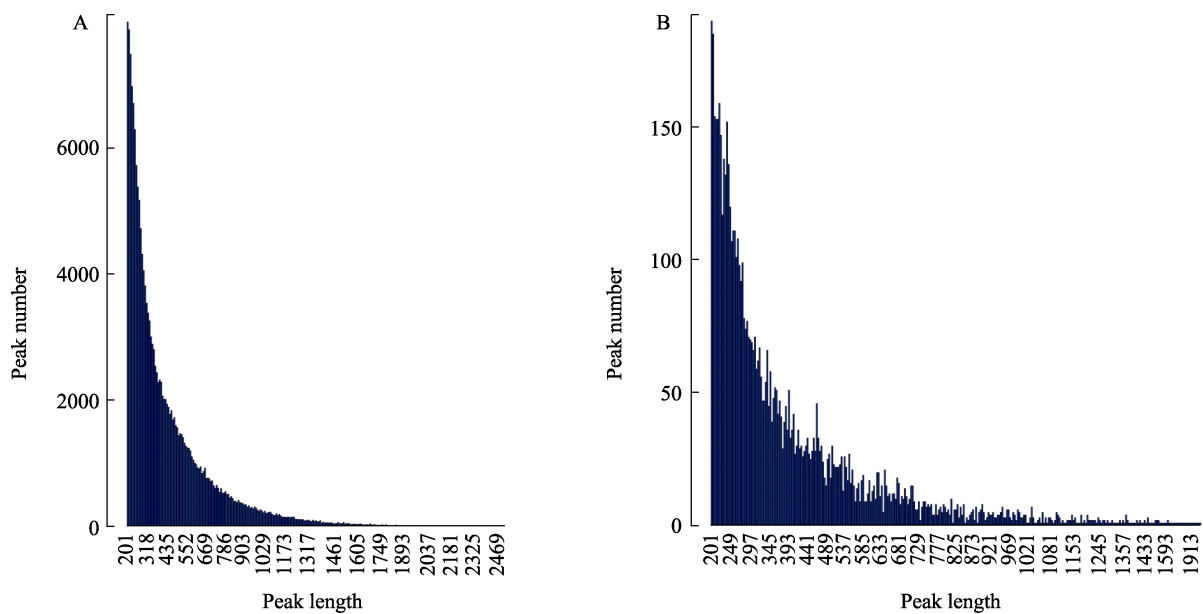
①③⑤为萼片; ②⑥为花瓣; ④为唇瓣; ⑦为合蕊柱。
①③⑤ are the sepals; ②⑥ are the petals; ④ is the labellum;
⑦ is the gynandrium.

图 1 WT 和 *DoAP3-3* 过表达花器官形态

Fig. 1 Morphological diagrams of floral organs in WT and overexpression *DoAP3-3* of *D. officinale*

2.2 DAP-seq 测序数据结果分析

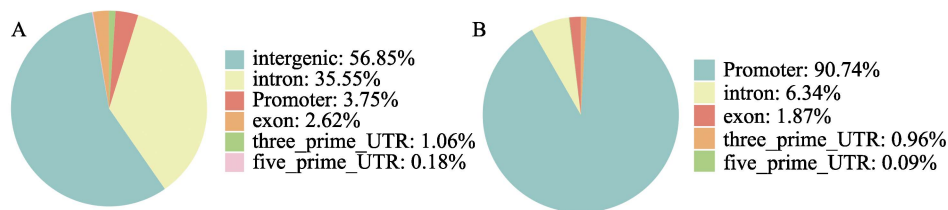
提取铁皮石斛叶片 DNA 进行 DAP-Seq 测序, 获得 DAP-seq 原始数据。将铁皮石斛 clean reads 数据比对到 *Dendrobium catenatum* (GCF_001605985.2) 基因组序列, 比对率达 99.72%, 并得到转录因子 *DoAP3-3* 结合的 peaks。对所有转录因子结合的 peaks 进行汇总和分类, 在基因组范围内共获得 175 468 个 peaks, 平均 peaks 长度为 399.43 bp, 对 peaks 各功能元件分布个数进行统计, 其中 6579 个 peaks 位于启动子区域上, 占 peaks 总数的 3.75% (图 2), 有 56.85% 位于基因间区, 3.75% 峰位于启动子区域, 5'-非翻译区和 3'-非翻译区分布最少 (图 3A)。位于启动子区域上的 peaks 有 90.74% 的峰都结合到启动子上 (图 3B)。这表明 *DoAP3-3* 是具有 DNA 结合能力和基因调控活性的转录因子。



A：全基因组范围内转录因子 DoAP3-3 结合峰分布；B：启动子区域范围内转录因子 DoAP3-3 结合峰分布。
A: Distribution of transcription factor DoAP3-3 binding peaks throughout in the genome-wide range; B: Distribution of transcription factor DoAP3-3 binding peaks in the promoter region.

图 2 DAP-seq 检测转录因子 DoAP3-3 结合峰分布

Fig. 2 Distribution of transcription factor DoAP3-3 binding peaks detected by DAP-seq



A：基因组范围内 peak 各功能元件分布统计；B：启动子区域范围内 peak 各功能元件分布统计。
A: Distribution statistics of peak functional elements in the genome-wide range; B: Distribution statistics of peak functional elements in the promoter region.

图 3 peak 各功能元件分布

Fig. 3 Distribution statistics of peak functional elements

2.3 DAP-seq 鉴定转录因子 DoAP3-3 结合花发育下游潜在靶标基因分析

在启动子范围内共筛选出 5768 个潜在结合靶基因，对应 6579 个 peaks，其中与花器官及花型发育相关的潜在靶基因共 82 个，对应 94 个 peaks。这些潜在结合靶基因包括转录因子家族基因和功能性蛋白基因，如 MYB-related、MADS-MIKC、AP2/ERF-ERF、B3、B3-ARF、C2C2-YABBY、HB-BELL、MADS-M-type、NAC 等转录因子家族基因（图 4）；TAA1、DCR、ERECTA 等功能性蛋白基因。

对 DAP-seq 检测到的与花发育相关的基因进行功能注释，筛选 $P<0.05$ 前 30 条途径进行富集分析，结果显示，铁皮石斛富集 GO 条目主要是

生物过程，包括繁殖结构发育、花器官发育、花轮发育等生物过程（图 5）。

2.4 转录组测序分析

对铁皮石斛野生型植株和 DoAP3-3 过表达植株分别提取生殖生长期花蕾 RNA，利用 Illumina 高通量测序平台进行 RNA 测序，共产出 15.88 Gb 数据，Q30 碱基百分比在 95.98%及以上。分别将各样品的 clean reads 与参考基因组进行序列比对，比对效率为 87.82%~91.43%。

2.5 转录组测序分析鉴定转录因子 DoAP3-3 调控花发育相关差异表达基因

为了鉴定在铁皮石斛中受 DoAP3-3 转录调控的基因，本研究通过转录组测序对铁皮石斛野生型植株（WT）和 DoAP3-3 过表达（OE）植

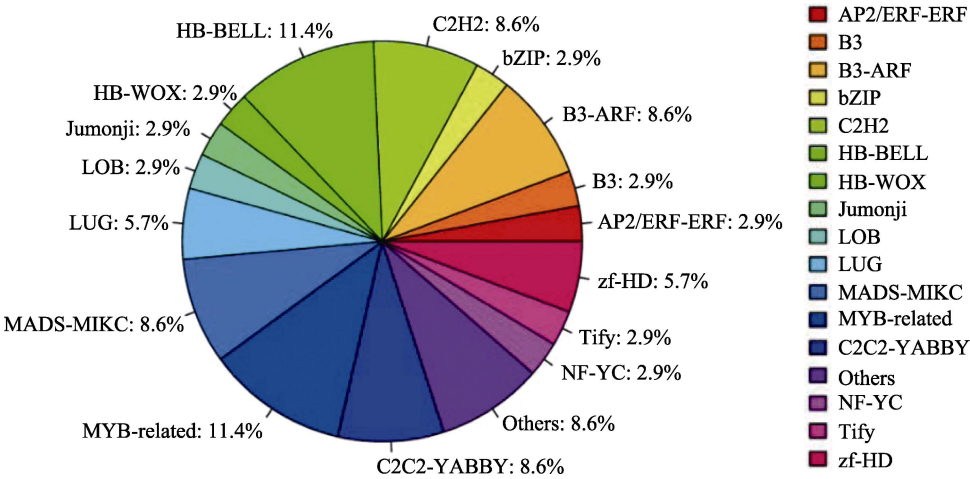


图 4 与花发育相关靶基因的转录因子预测

Fig. 4 Transcription factor prediction of target genes related to flower development

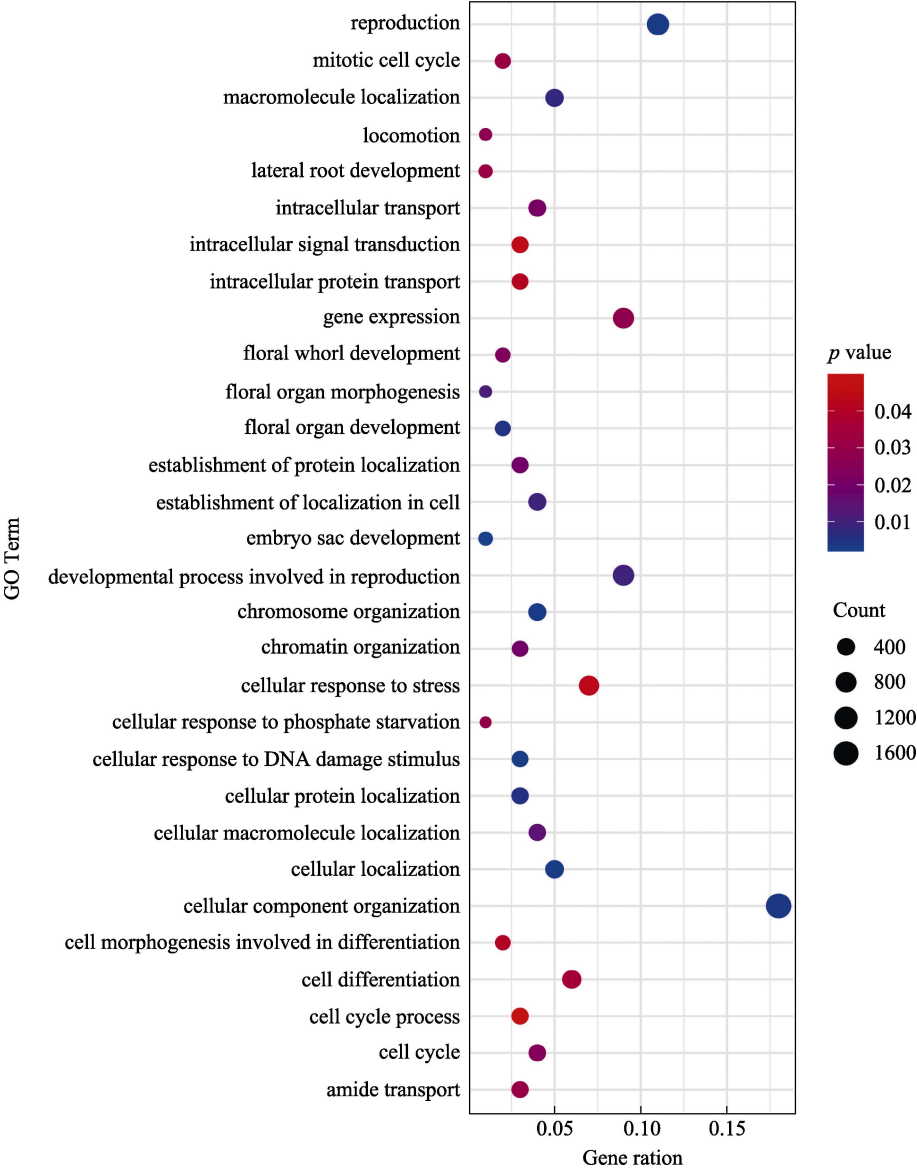
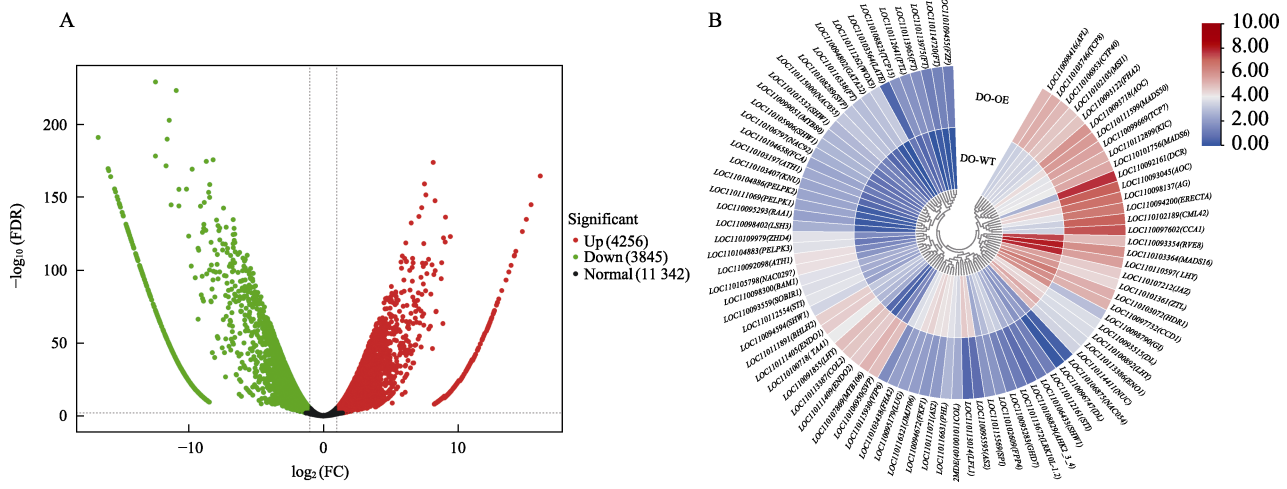


图 5 与花发育相关靶基因中前 30 条途径的 GO 富集分析

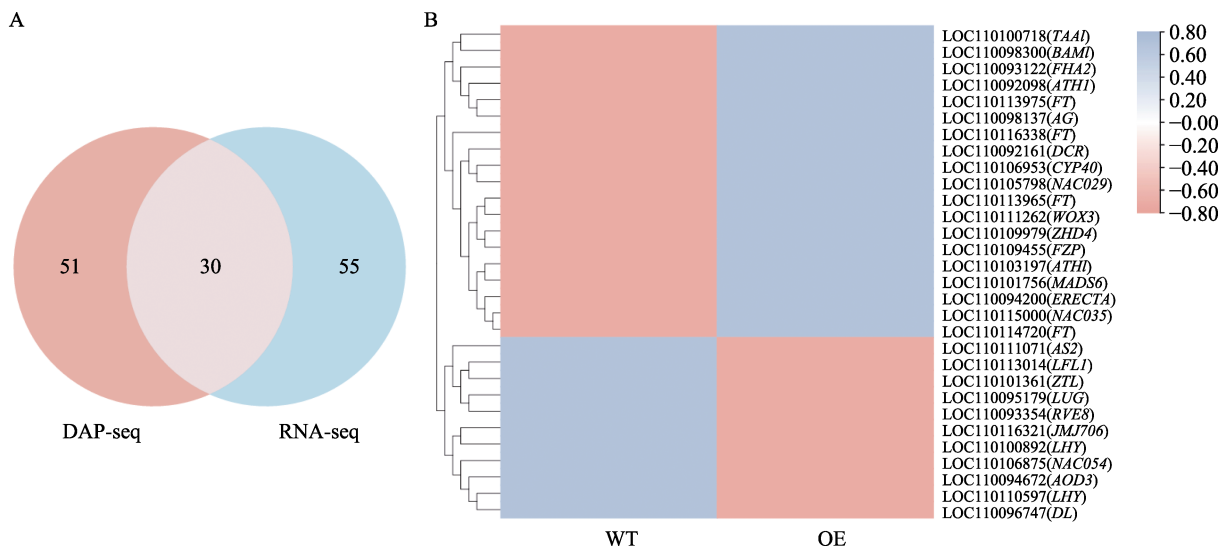
Fig. 5 GO enrichment analysis of the top 30 target genes related to flower development

株花蕾进行比较转录组分析,共发现 8101 个差异表达基因,其中 3845 个基因下调表达、4256 个基因上调表达(图 6A)。进一步对这些差异表达基因进行筛选,发现 86 个与花发育相关的差异表达基因,其中 32 个基因上调差异表达,54 个基因下调差异表达(图 6B)。AS2、MADS16、NAC054、DL、LFL1、GI 等基因在过表达植株中的表达量较低,均低于野生型植株。WOX3、FT、FZP、GATA22、ENDO2 等基因在过表达植株中的表达量较高,均高于野生型植株。



A: WT 与 OE 植株差异表达基因分析; B: 花发育相关的差异表达基因聚类热图分析。
A: Analysis of differentially expressed genes between WT and OE plants; B: Cluster heat map of differentially expressed genes associated with flower development.

图 6 差异表达基因分析
Fig. 6 Analysis of differentially expressed genes



A: 韦恩图; B: 30 个靶标基因聚类热图。
A: Venn diagram; B: clustering heat map of 30 target genes.
图 7 DAP-seq 与 RNA-seq 鉴定转录因子 DoAP3-3 调控花器官及花型发育的直接靶基因
Fig. 7 Direct target genes regulating flower organ and floral morphological characteristics development related to transcription factor DoAP3-3 identified by DAP-seq and RNA-seq

导有关,其中 *NAC035*、*FT*、*LFL1*、*LHY*、*ZHD4*、*ZTL*、*AOD3*、*RVE8* 参与调控开花时间;第二类与花器官原基形成即花器官发育有关,其中 *MADS6* 影响花分生组织决定性花器官发育、花器官形成及花轮形态发生, *FZP*、*BAM1* 决定花分生组织身份,指定花器官身份, *AG*、*CYP40* 参与花早期发育过程中器官身份的控制,在维持花分生组织的决定性中发挥作用, *DL* 决定心皮身份和花分生组织, *ATH1* 控制花器官与茎之间的边界形成,影响花器官脱落, *TAA1*、*FHA2* 影响花器官、雄蕊发育, *LUG* 调节花器官的发育, *JMJ706* 参与花形态发生;第三类参与花发育阶段花器官发育成熟即花型发育,其中 *NAC054*、*NAC029* 影响花朵发育, *WOX3* 参与萼片形成, *AS2* 影响花瓣发育, *ERECTA* 调控花形态和花序结构, *DCR* 影响毛状体形态发生。在 DoAP3-3 过表达植株中 *WOX3*、*NAC029*、*MADS6*、*ERECTA*、*AG* 表达量均高于野生型, *AS2*、*NAC054* 的表达量较低(图 8,图 9),结合过表达植株花型表型变化与其基因功能,这些基因极有可能是转录因子 DoAP3-3 的关键下游靶基因。

2.7 转录因子 DoAP3-3 调控花型关键候选靶基因分析

本研究从鉴定出的直接靶标基因中挑选出 7 个与花型发育密切相关的靶基因 *MADS6*、*NAC029*、*NAC054*、*WOX3*、*AS2*、*ERECTA*、*AG* 作为关键候选靶基因。对这 7 个靶基因进行顺式

作用元件分析,结果显示,除了含有多个转录起始核心元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,这 7 个基因启动区域分布的顺式作用元件与植物激素反应、光反应、植物生长发育、生物和非生物胁迫反应有关(图 10)。

为了更深入地了解 DoAP3-3 的 DNA 结合特性,本研究使用 MEME 和 MEME-CHIP 软件对 7 个候选靶基因的启动子与 peak 重叠序列分别进行 motif 分析和 motif 富集分析。motif 分析发现,除 *AG* 外其余靶基因均能与 motif1、motif2、motif3 结合(图 11)。motif 富集分析显示,富集到 BASIC PENTACYSTEINE (BPC) TFs 的结合基序的 GA/CT-rich (图 12)。

为了进一步验证 DoAP3-3 调控花型发育的直接作用,本研究选择在 DAP-seq 分析中启动子区域显示出富集结合位点(图 9,图 11)的 *MADS6* 基因作进一步验证,通过酵母单杂交实验验证 DoAP3-3 与其之间是否存在相互作用以调控花型变化。由图 13 可知,阳性对照(pGAD53m+pHIS2-p53)在 SD-TL、SD-TLH、SD-TLH+40 mmol/L 3AT 平板上均能正常生长;阴性对照组(pHIS2-MADS6+pGADT7)在 SD-TL、SD-TLH 平板上能正常生长,在 SD-TLH+40 mmol/L 3AT 平板上不生长;实验组(pHIS2-MADS6+pGADT7-DoAP3-3)在 SD-TL、SD-TLH 平板上能正常生长,在 SD-TLH+40 mmol/L 3AT 平板微弱生长,表明 DoAP3-3 与酵母中 *MADS6* 的启动子存在相互作用。

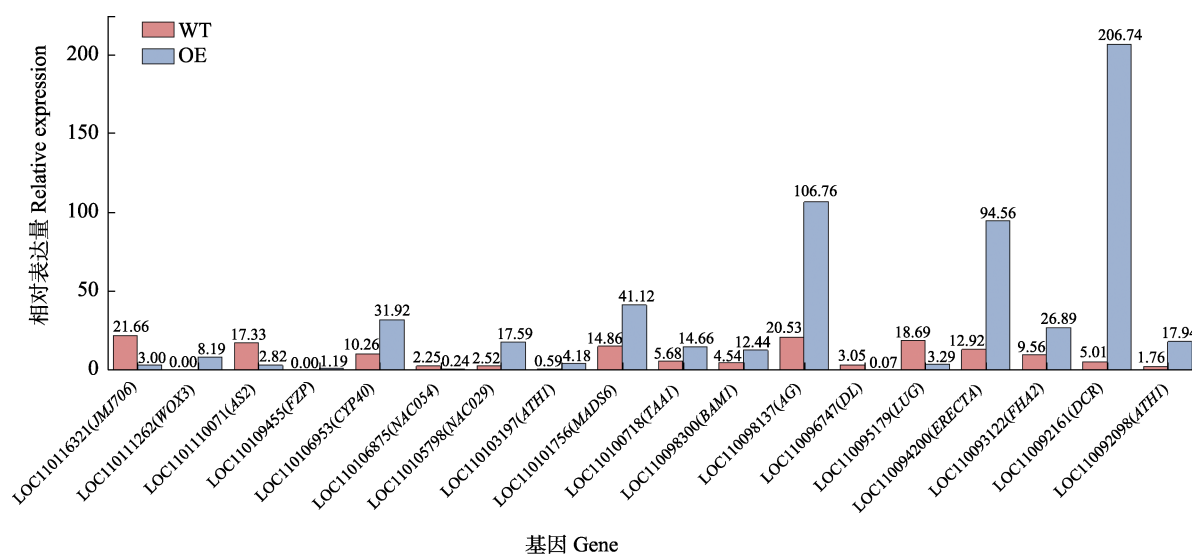


图 8 与花器官及花型发育相关靶基因表达量分析

Fig. 8 Analysis of the expression levels of target genes related to floral organ and floral morphological characteristics development

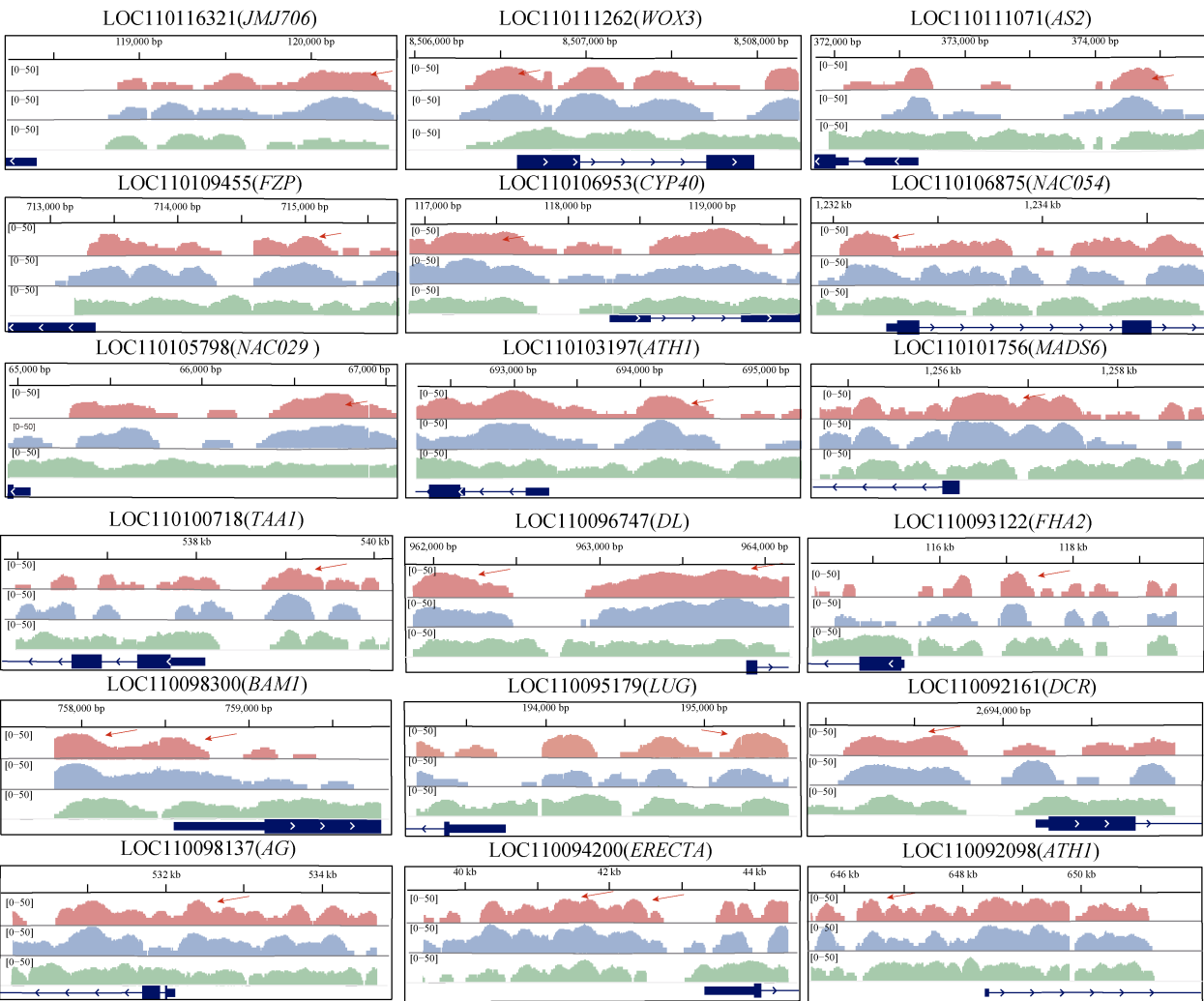


图 9 与花器官及花型发育相关靶基因 DAP-seq 结合峰图

Fig. 9 DAP-seq binding peak diagrams of target genes related to floral organ and floral morphological characteristics development

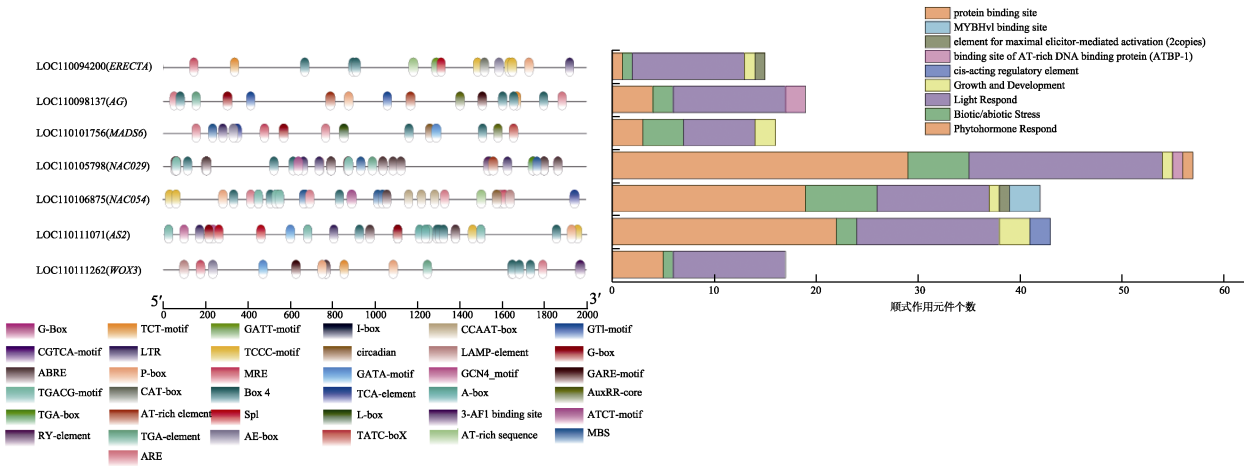


图 10 7 个调控花型变化关键下游靶基因顺式作用元件分析

Fig. 10 Analysis of cis-acting elements of 7 key downstream target genes which regulating floral morphological characteristics development

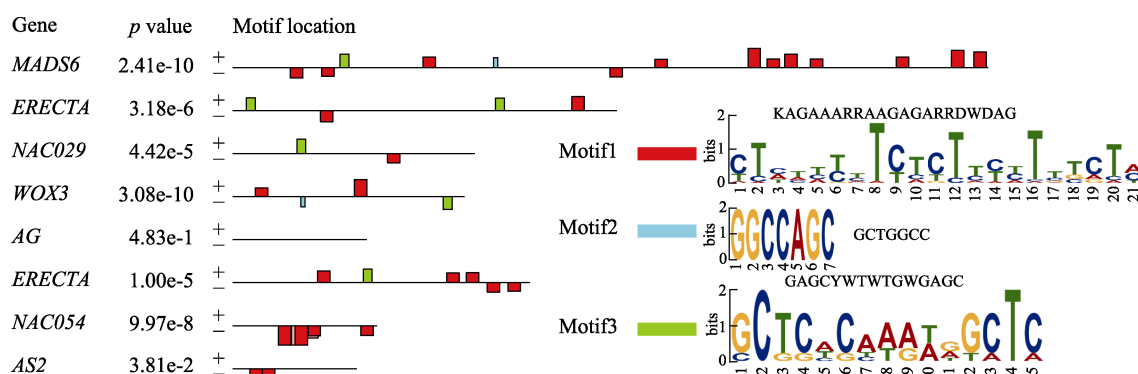


图 11 候选靶基因 motif 分析

Fig. 11 Motif analysis of candidate target genes

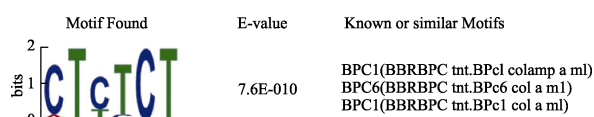


图 12 与花型发育相关候选靶基因 motif 富集分析

Fig. 12 Motif enrichment analysis of candidate target genes related to floral morphological characteristics development

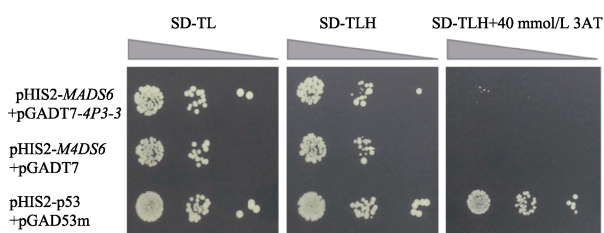


图 13 酵母单杂互作验证

Fig. 13 Yeast one-hybrid interaction verification

3 讨论

花是被子植物独有的非常重要的观赏及生殖器官。花器官在大小、形态、颜色等方面均有差异，但决定花器官身份特性的潜在遗传和分子机制是高度保守的，花器官的基本身份特征由一套核心的基因和调控网络决定，这些基因通过调节不同下游基因集的表达来控制花器官的发育和特征，而这种调控机制涉及复杂的基因网络和环境影响，以确保花器官在保持基本身份特征的同时，表现出丰富的特异性，如兰科植物由花瓣特化而来的唇瓣。

MADS6 在水稻中是 *AGL6-like* 的同源基因，调节花器官身份和花分生组织决定性。在 *AGL6-like* 突变体的花中，内稃和浆片的身份受到干扰，并观察到浆片-雄蕊的镶嵌器官^[23]；TSAI 等^[24]在蝴蝶兰中分离得到了 1 个 *GLOBOSA/*

PISTILLATA 样基因 *PeMADS6*，*PeMADS6* 的表达集中在萼片、花瓣和唇瓣原基中，通过异位过表达 *PeMADS6* 的拟南芥植物的花显示出花瓣状萼片的形态。有研究表明，靶基因 *NAC054* 的同源基因 *CUC1* 突变会导致花器官的轻微融合，而双重突变体 (*CUC1* 和 *CUC2* 同时突变) 则表现出严重的花器官融合现象^[25]。*AG* 作为 MIKCC 型 MADS-box 家族中的 C 类基因，不仅控制雄蕊、心皮的分化和发育，还调控花分生组织的终止^[26-27]。在 *AG* 基因突变体植株中，*WUS* 基因的高调表达能够诱导花分生组织发育过程产生不确定性，使得 *AG* 基因突变体植株的花器官出现只含萼片和花瓣，且数量不确定的轮轴，产生“花嵌花”的表型^[28]。本研究结果发现，在 *DoAP3-3* 过表达植株花朵表型中出现了花瓣-萼片的镶嵌器官，*MADS6*、*AG* 基因在过表达植株花朵中的表达量显著高于野生型，*NAC054* 在野生型和过表达植株中的表达量均较低，在过表达植株中表达量几乎为 0。因此，过表达植株花朵出现花瓣-萼片镶嵌器官可能是转录因子 *DoAP3-3* 正调控 *MADS6*、*AG* 基因，镶嵌器官可能是花瓣状萼片，也可能是 *DoAP3-3* 负调控 *NAC054* 造成花瓣和萼片基部融合现象。

PRS 是 *WOX3* 的一个同源基因，在 *PRS* 突变体中，*PRS* 基因的表达受到抑制，导致侧生萼片发育受到抑制，萼片边缘细胞缺失，侧生萼片缺失或变小，导致发育不对称，从而造成花器官形态异常等现象^[29]。本研究获得的 *DoAP3-3* 过表达植株花朵中，花器官萼片左右两侧大小不一，右侧萼片明显大于左侧萼片，且 *WOX3* 基因在野生型植株花朵中不表达，在过表达植株花朵中低表达，这表明 *WOX3* 基因的过表达和低表达均会影响萼

片发育。*AS2*^[30]作为 *AS2/LOB* (基因家族的成员,除了在叶片极性形成中调节外,在花发育中具有独立的功能^[31]。*AS2* 与 *ASL*^[32]相互作用共同调控花瓣的近端-远端对称性,从而影响花瓣形态和功能。在单突变体 (*AS2* 或 *ASL1*) 中,花瓣的形态发育异常并不明显,但在双突变体 (*AS2* 和 *ASL1*) 中,花瓣的形态异常更加显著;*ASL1* 和 *AS2* 的过表达会导致 *BP* 表达的下调,而 *BP* 的过表达则会导致花瓣形态异常,如花瓣变长和向外卷曲,因此 *ASL1* 和 *AS2* 通过抑制 *KNOX* 基因 (如 *BP*) 的表达来调控花瓣的极性^[33]。在某些极性异常的花瓣中,由于细胞扩展和分化异常导致花瓣基部可能出现膨大现象;或花瓣可能偏离正常位置,导致花对称性破坏;或导致花瓣与萼片等其他花器官的重叠现象,影响花的整体形态。因此 *AS2* 可能通过与其他基因相互作用,影响花瓣和萼片的近端-远端极性,在维持花器官正常形态和对称性中发挥重要作用。

NAP 作为 *NAC029* 的同源基因,在模式植物拟南芥中已被鉴定为是花同源基因 *APETALA3/PISTILLATA* 的直接靶标,参与调控花瓣和雄蕊的形成,该研究在拟南芥中敲除了 *AP3-3*,导致花瓣被萼片状的器官替代,雄蕊被心皮状的器官替代,通常与第四轮的心皮融合^[34]。而 *NAP* 基因的过表达会造成花瓣和雄蕊生长受抑制,导致花瓣短小且雄蕊缩短,因此 *NAP* 正常表达是保证花瓣和雄蕊细胞适时扩张和器官成熟的关键。本研究鉴定出 *NAC029* 在过表达植株中的表达量高于野生型,*NAC029* 与 *NAP* 基因属于同源基因,这表明其功能可能在一定程度上是保守的,可能存在保守的 TF-Target 关系,因此推测 *NAC029* 或许是转录因子 DoAP3-3 的关键靶基因之一。

ERECTA 基因影响细胞分裂的速率和模式,被认为是植株在不同发育环境下的生长调节因子,*ERECTA* 编码一个富含亮氨酸重复片段的类受体丝氨酸/苏氨酸激酶,它与细胞的增殖有关并且被认为是植物生长因子受体^[35]。在 *ER* 突变体中,花器官的细胞分裂速率降低会导致细胞数量减少;*ER* 基因的过表达会促进细胞分裂和扩展。在过表达 *ER* 基因的植物中,细胞分裂速率加快,细胞体积增大,从而导致组织和器官的增大,这表明 *ER* 基因在维持正常的细胞分裂速率中发挥重要作用^[36]。大多数花器官是从变态叶发育而来的,*ER* 可以通过控制花瓣细胞增殖来调节花瓣的

形状和大小,有研究者推测 *ER* 可能是控制不同植物花器官形态差异的主要因素^[37]。兰科植物唇瓣是花瓣特化而来,在 *DoAP3-3* 过表达花器官中,*ERECTA* 的表达量显著高于野生型,且 *ERECTA* 在启动子范围内有 2 个结合峰,与转录因子 DoAP3-3 结合强度较强,结合其功能特征,这或许可以解释过表达植株唇瓣比野生型唇瓣明显增大的原因。

本研究成功鉴定出转录因子 DoAP3-3 的 7 个靶标基因,DoAP3-3 通过结合 GA/CT 基序来调控这 7 个靶基因的表达。CArG box motif [CC (A+T-rich) 6GG] 是 AP3-3 最常见的结合位点^[17],MADS 结构域蛋白已被证明在体外可以与非 CArG 盒序列结合^[38],这意味其在基因表达调控中有更广泛的多样性和复杂性。即使这些基因调控序列中不存在 CArG 盒,DoAP3-3 结构域蛋白仍然有可能与其他基序结合,并调控这些基因的表达。本研究通过酵母单杂交实验验证 DoAP3-3 与 *MADS6* 之间存在相互作用,表明 DoAP3-3 通过调控 *MADS6* 的表达,进而影响花型发育。DoAP3-3 是否与其他靶基因之间存在相互作用,后续还需进行转录因子与靶基因启动子互作实验研究。

4 结论

DAP-seq 作为体外检测转录因子结合位点的一种方法,成功将体内结合实验转移到体外,极大地提高了 DNA 结合位点发现的效率,可用于非模式植物转录因子的研究。在本课题组的前期研究基础上,通过瓶内开花技术,培育出铁皮石斛过表达植株花朵,并对其转录组测序分析;通过 DAP-seq 和 RNA-seq 联合分析成功鉴定出与转录因子 DoAP3-3 直接结合并调控花型形态发育的 7 个关键候选靶标基因: *MADS6*、*NAC029*、*NAC054*、*WOX3*、*AS2*、*ERECTA*、*AG*。这些基因可能通过特异性调控或与其他基因相互作用,在调控花型形态发育中发挥重要功能。该研究为初步解析花器官特征基因 *DoAP3-3* 与其靶基因之间的调控机制,探究兰科植物中高度特化和多样化的花形态形成机理奠定基础。

参考文献

- [1] HSU H F, HSU W H, LEE Y I, MAO W T, YANG J Y, LI J Y, YANG C H. Model for perianth formation in orchids[J]. *Nature Plants*, 2015, 1(5): 1-8.
- [2] PAN Z J, CHENG C C, TSAI W C, CHUNG M C, CHEN

- W H, HU J M, CHEN H H. The duplicated B-class MADS-box genes display dualistic characters in orchid floral organ identity and growth[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(9): 1515-1531.
- [3] IRISH V. The ABC model of floral development[J]. *Current Biology*, 2017, 27(17): R887-R890.
- [4] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353(6339): 31-37.
- [5] SCHNEITZ K. The molecular and genetic control of ovule development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(1): 13-17.
- [6] ANGENENT G C, FRANKEN J, BUSSCHER M, VAN DIJKEN A, VAN WENT J L, DONS H J, VAN TUNEN A J. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(10): 1569-1582.
- [7] FERRARIO S, IMMINK R G, SHCHENNIKOVA A, BUSSCHER-LANGE J, ANGENENT G C. The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in petunia[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 914-925.
- [8] HONMA T, GOTO K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 525-529.
- [9] TSAI W C, CHEN H H. The orchid MADS-box genes controlling floral morphogenesis[J]. *The Scientific World Journal*, 2006(6): 1933-1944.
- [10] MONDRAGÓN-PALOMINO M, THEISSEN G. MADS about the evolution of orchid flowers[J]. *Trends in Plant Science*, 2008(13): 51-59.
- [11] MONDRAGÓN-PALOMINO M, THEISSEN G. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes[J]. *Annals of Botany*, 2009, 104(3): 583-594.
- [12] 王莹, 穆艳霞, 王锦. MADS-box 基因家族调控植物花器官发育研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(6): 1149-1158.
- WANG Y, MU Y X, WANG J. Research progress of floral development regulation by MADS-box gene family[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural*, 2021, 33(6): 1149-1158. (in Chinese)
- [13] RYAN P T, Ó'MAOILÉIDIGH D S, DROST H G, KWAŚNIEWSKA K, GABEL A, GROSSE I, GRACIET E, QUINT M, WELLMER F. Patterns of gene expression during *Arabidopsis* flower development from the time of initiation to maturation[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 488.
- [14] CAI J, LIU X, VANNESTE K, PROOST S, TSAI W C, LIU K W, CHEN L J, HE Y, XU Q, BIAN C, ZHENG Z, SUN F, LIU W, HSIAO Y Y, PAN Z J, HSU C C, YANG Y P, HSU Y C, CHUANG Y C, DIEVART A, DUFAYARD J F, XU X, WANG J Y, WANG J, XIAO X J, ZHAO X M, DU R, ZHANG G Q, WANG M, SU Y Y, XIE G C, LIU G H, LI L Q, HUANG L Q, LUO Y B, CHEN H H, VAN DE PEER Y, LIU Z J. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(1): 65-72.
- [15] TSAI W C, KUOH C S, CHUANG M H, CHEN W H, CHEN H H. Four *DEF*-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid[J]. *Plant And Cell Physiology*, 2004, 45(7): 831-844.
- [16] ZHANG R, GUO C C, ZHANG W G, WANG P P, LI L, DUAN X S, DU Q G, ZHAO L, SHAN H Y, HODGES S A, KRAMER E M, REN Y, KONG H Z. Disruption of the petal identity gene *APETALA3-3* is highly correlated with loss of petals within the buttercup family (Ranunculaceae)[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2013, 110(13): 5074-5079.
- [17] JIANG Y C, WANG M M, ZHANG R, XIE J H, DUAN X S, SHAN H Y, XU G X, KONG H Z. Identification of the target genes of *AqAPETALA3-3* (*AqAP3-3*) in *Aquilegia coerulea* (Ranunculaceae) helps understand the molecular bases of the conserved and nonconserved features of petals[J]. *New Phytologist*, 2020, 227(4): 1235-1248.
- [18] BARTLETT A, O'MALLEY R C, HUANG S C, GALLI M, NERY J R, GALLAVOTTI A, ECKER J R. Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(8): 1659-1672.
- [19] LI M R, CHEN M W, ZHANG Y L, ZHAO L G, ZHANG J C, SONG H. Identification of the target genes of AhTWRKY24 and AhTWRKY106 transcription factors reveals their regulatory network in *Arachis hypogaea* cv. Tifrunner using DAP-seq[J]. *Oil Crop Science*, 2023, 8(2): 89-96.
- [20] SI J, FAN Z Q, WU C J, YANG Y Y, SHAN W, KUANG J F, LU W J, WEI W, CHEN J Y. MaHsf24, a novel negative modulator, regulates cold tolerance in banana fruits by repressing the expression of *HSPs* and antioxidant enzyme genes[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(10): 2873-2886.
- [21] SUN Y, WU Q, PAN J, LI T, LIU L, CHEN D, ZHANG X, CHEN H, LI Y, LIN R. Identification of differentially expressed genes and signalling pathways in the ovary of higher and lower laying ducks[J]. *British Poultry Science*, 2020, 61(6): 609-614.
- [22] LIU K D, FENG S X, PAN Y L, ZHONG J D, CHEN Y, YUAN C C, LI H L. Transcriptome analysis and identification of genes associated with floral transition and flower development in sugar apple (*Annona squamosa* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 1695.
- [23] OHOMORI S, KIMIZU M, SUGITA M, MIYAO A, HIROCHIKA H, UCHIDA E, NAGATO Y, YOSHIDA H.

- MOSAIC FLORAL ORGANS1, an AGL6-like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(10): 3008-3025.
- [24] TSAI W C, LEE P F, CHEN H I, HSIAO Y Y, WEI W J, PAN Z J, CHUANG M H, KUOH C S, CHEN W H, CHEN H H. *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(7): 1125-1139.
- [25] AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, FUJISAWA H, TASAKA M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841-857.
- [26] YANOFSKY M F, MA H, BOWMAN J L, DREWS G N, FELDMANN K A, MEYEROWITZ E M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors[J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 35-39.
- [27] SIEBURTH L E, RUNNING M P, MEYEROWITZ E M. Genetic separation of third and fourth whorl functions of *AGAMOUS*[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(8): 1249-1258.
- [28] LENHARD M, BOHNERT A, JÜRGENS G, LAUX T. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*[J]. *Cell*, 2001, 105(6): 805-814.
- [29] MATSUNOTO N, OKADA K. A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(24): 3355-3364.
- [30] IWAKAWA H, UENO Y, SEMIARTI E, ONOUCHI H, KOJIMA S, TSUKAYA H, HASEBE M, SOMA T, IKEZAKI M, MACHIDA C, MACHIDA Y. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper[J]. *Plant And Cell Physiology*, 2002, 43(5): 467-478.
- [31] XU L, XU Y, DONG A W, SUN Y, PI L M, XU Y Q, HUAN H. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity[J]. *Development*, 2003, 130(17): 4097-4107.
- [32] SHUAI B, REYNAGA-PÉÑA C G, SPRINGER P S. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 747-761.
- [33] CHALFON-JUNIOR A, FRANKEN J, MES J J, MARSCHMARTINEZ N, PEREIRA A, ANGENENT G C. *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1* gene, a member of the *AS2/LOB* family, controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(4): 559-575.
- [34] SABLOWSKI R W, MRYEROWITZ E M. A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*[J]. *Cell*, 1998, 92(1): 93-103.
- [35] ABRAHAM M C, METHEETRAIRUT C, IRISH V F. Natural variation identifies multiple loci controlling petal shape and size in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56743.
- [36] DOUGLAS S J, CHUCK G, DENGLER R E, PELECANDA L, RIGGS C D. *KNAT1* and *ERECTA* regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 547-558.
- [37] 赵雪雅, 张坤鹏, 张汇东, 毕梦希, 齐明芳. *ERECTA* 基因家族调控植物形态发育机制研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2023, 54(2): 231-238.
ZHAO X Y, ZHANG K P, ZHANG H D, BI M X, QI M F. Research progress on the mechanism of *ERECTA* gene family regulating plant morphological development[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2023, 54(2): 231-238. (in Chinese)
- [38] ZIK M, IRISH V F. Global identification of target genes regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 207-222.