

7DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00905

大豆细胞质雄性不育系 MADS-box 基因的分离分析

韩利涛 姜伟 杨守萍* 喻德跃 盖钧镒*

南京农业大学 / 国家大豆改良中心 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095

摘要: 采用 cDNA-AFLP 差异显示技术对大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 间基因差异表达进行研究, 结果从 NJCMS2A 花蕾中分离到一个差异表达片段, 对该差异片段进行克隆、测序和序列比对分析, Blast 检索结果显示它与大豆基因组中 Gm13 上 g29510.1 cDNA 片段的同源率达 98.7%, 与大豆中一个 MADS-box 基因的同源性达 98%, 氨基酸序列比对结果表明它与大豆中一个 MADS-box 蛋白有 96% 的同源性, 与豌豆中 MADS-box M7 蛋白有 83% 的同源性, 与苦瓜中 MADS-box2 蛋白有 88% 的同源性, 与海岛棉典型的 MADS-box 基因编码的 AGAMOUS 蛋白保守区有 83% 的同源性, 进一步对其氨基酸序列进行结构和功能预测显示该差异片段具有 MADS-box 转录因子的典型结构域 K-box, 证明其编码蛋白为一 MADS-box 转录因子, 半定量 RT-PCR 分析结果显示其在 NJCMS2A 花蕾中表达量很高, 而在 NJCMS2B 花蕾中表达量很低, 推测该差异片段可能与大豆细胞质雄性不育有关。

关键词: 大豆; 细胞质雄性不育; cDNA-AFLP; MADS-box 转录因子

Isolation and Analysis of MADS-box Gene from Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Cytoplasmic Male Sterile Line

HAN Li-Tao, JIANG Wei, YANG Shou-Ping*, YU De-Yue, and GAI Jun-Yi*

National Center for Soybean Improvement / National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement / Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: CMS (cytoplasmic male sterility) plays an important role in the utilization of crop heterosis. It is of important significance on theory and practice to study the genetic base and mechanism of CMS. To reveal the molecular mechanism of soybean cytoplasmic male sterility, we analyzed the gene differential expression between the soybean cytoplasmic male sterile line NJCMS2A and its maintainer line NJCMS2B by the cDNA-AFLP differential display method. A differentially expressed fragment from the flower buds of NJCMS2A was cloned and sequenced. The Blast results showed that the differentially expressed fragment shared 98.7% homology with g29510.1 cDNA fragment on Gm13 of soybean genome, and 98% homology with a MADS-box gene of soybean. The Blast results of the amino acid sequences indicated that the differentially expressed fragment shared 96% homology with a MADS-box protein of *Glycine max*, 83% homology with the MADS-box M7 protein of *Pisum sativum*, 88% homology with the MADS-box 2 protein of *Momordica charantia*, and 83% homology with AGAMOUS protein of *Gossypium barbadense*. The structure and function prediction of the amino acid sequence showed that the protein encoded by the differentially expressed fragment was the transcription factor of the MADS-box gene which contained a typical K-box domain. The results of semi-quantitative RT-PCR showed that the expression quantity of the differentially expressed fragment in the flower buds of NJCMS2A was much higher than that of NJCMS2B. According to the above results, it was inferred that the differentially expressed fragment was probably related to the soybean cytoplasmic male sterility.

Keywords: Soybean; Cytoplasmic male sterility; cDNA-AFLP; MADS-box transcription factor

cDNA-AFLP 技术是 Bachem 等^[1]发明的用于 mRNA 表达差异分析的一种方法, 具有反应条件严谨、退火温度高、重复性好等特点, 已被广泛用于

许多植物种属基因的差异表达研究。Habu 等^[2]利用 cDNA-AFLP 程序, 比较普通牵牛花白花、红花两个品系的花芽 mRNA, 获得了 2 个差异表达 cDNA 片

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2009AA101106)和作物遗传与种质创新国家重点实验室开放基金(ZW2007004)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 杨守萍, E-mail: spyang@njau.edu.cn, Tel: 025-84396463; 盖钧镒, E-mail: sri@njau.edu.cn, Tel: 025-84395405

第一作者联系方式: E-mail: hanlitao0210@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2009-12-21; Accepted(接受日期): 2010-03-19.

段。Van Der Bizen 等^[3]利用 cDNA-AFLP 技术分离了寄生虫侵染拟南芥相互作用诱导的一些基因片段。Qin 等^[4]分离了几个新的线虫侵染土豆过程中特异表达的基因片段。凌杏元等^[5]利用线粒体 RNA 合成 cDNA 进行选择扩增, 比较野生型水稻不育系、保持系和 F₁ 杂种线粒体 RNA 差异, 找到一条可能与育性有关的差异表达条带, 并进行了验证。吴敏生等^[6]为揭示杂种优势的基本原理, 利用 cDNA-AFLP 技术对玉米自交系和杂种一代的差异表达基因的表达量变化进行了研究。借助 cDNA-AFLP 分析技术, 王永勤等^[7]从白菜两用系花蕾中分离得到了 4 个在不同发育时期特异表达的基因 *BCMF1*、*BCMF2*、*BCMF3*、*BCMF4*, 其中基因 *BCMF2*、*BCMF3*、*BCMF4* 分别与编码拟南芥多聚半乳糖醛酸酶、大白菜果胶甲酯酶和油菜多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的基因有关。

MADS-box 基因家族是一类非常重要的调节基因家族, 具有特定的保守结构域, 通过其保守结构域与特定的 DNA 序列结合来调控基因的表达^[8]。植物的 MADS 基因家族成员庞大, 对拟南芥和水稻全基因组范围的研究发现分别有 107 个和 71 个基因家族成员^[9-10]。在植物的许多发育阶段, MADS-box 家族基因都扮演了重要的角色, 包括开花时间控制(如 *FLC*、*SOCI*、*SVP*), 分生组织特征决定(如 *CAL*、*API*、*FUL*), 花器官决定(如 *AG*、*API*、*AP3*、*SEPI*~3), 果实成熟(如 *SHPI*、*FUL*), 胚发育(*AGLI5*), 营养器官如叶(*AGLI6*)和根(*AGLI9*)的发育等^[11-14]。

细胞质雄性不育(CMS)是一种受细胞核和细胞质遗传物质双重控制的母性遗传性状, 它不仅是杂种优势广泛利用的基础, 还为细胞质遗传和核质互作研究提供了极好的材料。大豆是重要的蛋白脂肪兼用作物, 产量一直是大豆生产的制约因素, 杂种大豆可显著提高单产和抗逆性, 因而, 应用杂种优势是发展我国大豆生产的重要途径之一。本研究通过 cDNA-AFLP 差异显示技术从大豆细胞质雄性不育系中分离得到一个 MADS-box 转录因子基因, 根据所得片段序列设计引物, 对该基因在不育系和保持系花中的表达进行 RT-PCR 扩增, 对扩增到的基因片段进行克隆和序列分析, 以进一步探讨该 MADS-box 转录因子基因的表达与大豆细胞质雄性不育的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料和处理

以大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 与其保持

系 NJCMS2B 为材料。NJCMS2A 是以两个栽培大豆杂交组合(N8855×N1628)F₂ 不育株为母本, N1628 为轮回亲本连续回交多代, 得到的细胞质雄性不育系, N1628(NJCMS2B)为其同型保持系^[15]。

2007 年和 2008 年夏将不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 种植于南京农业大学国家大豆改良中心江浦试验站。在大豆开花期随机选取不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 各 10 株, 按单株分别取其大、中、小花蕾和成熟花, 经液氮速冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 的提取与双链 cDNA 的合成

采用 RNAsimple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒(离心柱型, 天根生化科技有限公司)提取不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 的花蕾和成熟花的总 RNA, 利用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒(宝生物工程大连有限公司)合成 cDNA 双链, 具体方法参考试剂盒说明书。

1.3 双链 cDNA 纯化浓缩、限制性双酶切和接头序列

采用苯酚/氯仿/异戊醇(体积比为 25 24 1)溶液纯化双链 cDNA, 无水乙醇沉淀后浓缩, 加适量的灭菌蒸馏水稀释, 依据 A₂₆₀ 值将双链 cDNA 含量调整至相同浓度。以常规方法进行 *Mse* I 和 *Pst* I 限制性双酶切, 其中, *Mse* I 接头序列为 5'-GACGATG AGTCCTGAG-3'(正向)和 5'-TACTCAGGACTCAT-3'(反向), *Pst* I 接头序列为 5'-CTCGTAGACTGCGTAC ATGCA-3'(正向)和 5'-CATCTGACGCATGT-3'(反向)。

1.4 cDNA-AFLP 预扩增和选择性扩增

参照 Bachem 等^[16]所述方法, 将完成限制性双酶切和连接接头的产物进行 10× 稀释, 然后预扩增。预扩增 PCR 程序为 94℃, 2 min; (95℃, 30 s; 56℃, 30 s; 72℃, 60 s), 30 个循环; 72℃, 10 min。于 4℃ 保存预扩增产物。预扩增的引物序列为 P+0 (5'-GACTGC GTACATGCAG-3'), M+C(5'-GATGAGTCCTGAGTA AC-3'), 分别与 *Mse* I 和 *Pst* I 的接头序列相匹配。选用 16 条 M 引物和 14 条 P 引物进行选择扩增, 每条 M 引物分别与 P 引物进行组合, 共有 224 对组合。cDNA-AFLP 选择性扩增程序为 95℃, 2 min; [94℃, 30 s; 65℃, 30 s (每循环 -0.7℃); 72℃, 60 s], 13 个循环; (95℃, 30 s; 56℃, 30 s; 72℃, 60 s), 25 个循环; 72℃, 10 min。

1.5 cDNA-AFLP 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染显影

采用常规技术进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色

和显影, 用凝胶成像仪(Pharmacia Biotech Image Master)进行图像扫描, 记录实验结果。

1.6 差异条带 DNA 二次扩增和克隆

从聚丙烯酰胺凝胶上切下重复性好、稳定一致的差异条带, 以 90℃ 处理 20 min, 12 000×g 离心 5 min 后, 吸取上清液 2 μL 作为二次 PCR 扩增的模板。PCR 体系及程序与前述选择性扩增相同, 其中, 二次扩增时选用的引物, 与 cDNA-AFLP 中鉴定该特异表达的引物一致。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 与 pMD19-T 载体(宝生物工程大连有限公司)连接, 转化感受态大肠杆菌菌株 DH5α, 提取单菌落克隆质粒, 进一步用菌液 PCR 对克隆片段进行检测, 确认与目的片段大小一致后送上海英骏生物技术有限公司测序, 获得 EST 序列。

1.7 基因片段的引物设计

根据所得片段序列, 采用 primer premier 5.0 引物设计软件设计引物, 其 FP 引物序列为 5'-CATTAGCCTCAGAAGCAG-3', RP 引物序列为 5'-GACCCATCCATGTCAGTT-3'。

1.8 RT-PCR

采用两步法进行 RT-PCR, 程序如下: (1) 采用天根生化科技有限公司的 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒, 参考试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。(2) 在 PCR 管中依次加入 cDNA 1 μL、10×PCR buffer 2 μL、25 mmol L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μL、10 mmol L⁻¹ dNTPs mix 0.4 μL、10 pmol L⁻¹ 引物 FP 1 μL、10 pmol L⁻¹ 引物 RP 1 μL、5 U μL⁻¹ Taq 0.2 μL, 以 ddH₂O 调节至 20 μL。PCR 程序为 94℃, 2 min; (95℃, 30 s; 56℃, 30 s; 72℃, 60 s), 30 个循环; 72℃, 10 min; 保持 4℃。

1.9 序列分析

对所得到的序列在大豆基因组库中进行同源性比对, 并在 NCBI 的 Blastx 在线进行同源性比对, 采用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Inter-ProScan/index.html>)在线进行结构域和功能位点预测。

2 结果与分析

2.1 花蕾总 RNA 的检测

利用混合花蕾取样法分别对大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 不同发育时期的花蕾和成熟花进行取样, 提取其总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳(图 1)和微量紫外分光光度计检测。图 1 显示, 总 RNA 中的 28S rRNA 与 18S rRNA 亮度比

约为 2:1, 紫外分光光度计检测结果显示 A_{260}/A_{280} 约为 2.0, A_{260}/A_{230} 2.0, 表明所提取的总 RNA 纯度较高, 质量较好。

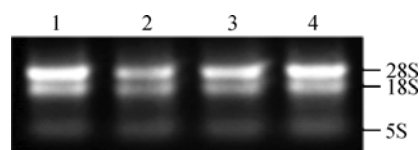


图 1 NJCMS2A 与 NJCMS2B 的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis profile of total RNA from NJCMS2A and NJCMS2B

1: NJCMS2A 花蕾; 2: NJCMS2A 成熟花; 3: NJCMS2B 花蕾;
4: NJCMS2B 成熟花。
1: NJCMS2A flower buds; 2: NJCMS2A flowers; 3: NJCMS2B flower buds; 4: NJCMS2B flowers.

2.2 以 cDNA-AFLP 分离得到差异片段

采用 224 对引物对大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 的差异表达进行分析, 选择在 NJCMS2A 与 NJCMS2B 之间存在明显差异的条带进行回收、克隆。经过 cDNA-AFLP 分析发现应用引物组合 P11/M2 在 NJCMS2A 中得到一个差异表达片段, 图 2 中聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示在 NJCMS2A 花蕾和成熟花中有一条高表达的条带, 而在 NJCMS2B 花蕾和成熟花中则没有看到有条带, 将该差异片段所处的 PAGE 胶用干净刀片切下, 转入离心管, 加入 20 μL ddH₂O, 用枪头捣碎, 90℃ 煮 20 min, 稍微离心, 取 2 μL 上清液作为模板进行 2 次 PCR 扩增。

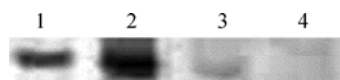


图 2 引物组合 P11/M2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis profile of primer combination P11/M2

1: NJCMS2A 花蕾; 2: NJCMS2A 成熟花; 3: NJCMS2B 花蕾;
4: NJCMS2B 成熟花。
1: NJCMS2A flower buds; 2: NJCMS2A flowers; 3: NJCMS2B flower buds; 4: NJCMS2B flowers.

2.3 差异片段序列分析

对 NJCMS2A 花蕾中扩增的差异片段进行回收、克隆和测序, 得到一个 396 bp 的 cDNA 片段。将该差异片段的序列在大豆基因组库中进行同源性比对, 发现其与 Gm13 上 g29510.1cDNA 片段的同源性达 98.7%, 利用 NCBI 数据库进行在线比对, 发现其与大豆中一个 MADS-box 基因的同源性达 98%, 与日本百脉根的一个 MADS-box 基因的同源性达 88%,

与一个槐属的典型 MADS-box 基因 *agamous* 的同源性达 91%，与耀花豆属中一个典型 MADS-box 基因 *agamous* 的同源性达 90%，从以上比对结果可以看出，该差异片段与 MADS-box 基因保守区有很高的同源性。利用 InterProScan 进行预测，发现该差异片段具有 MADS-box 蛋白典型的 K-box 结构域(图 3)，表明该差异片段为一个 MADS-box 基因片段。

2.4 同源比对与进化分析

以该差异片段编码的氨基酸序列在 NCBI 上进

行同源性比对，发现其与多个物种的 MADS-box 蛋白或转录因子有较高的相似度，如与大豆中一个 MADS-box 蛋白有 96% 的同源性，与豌豆中 MADS-box M7 蛋白有 83% 的同源性，与苦瓜中 MADS-box 2 蛋白有 88% 的同源性，与海岛棉典型的 MADS-box 基因编码的 AGAMOUS 蛋白保守区有 83% 的同源性。与该差异片段同源性较高的部分植物的 MADS-box 基因的氨基酸序列的系统进化树见图 4。

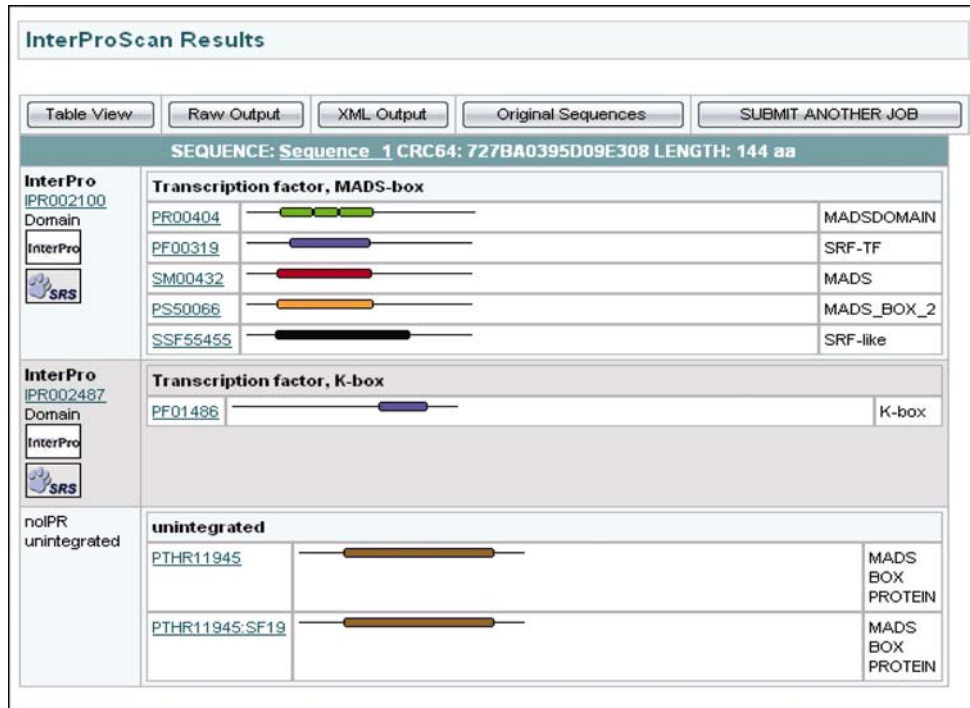


图 3 差异片段的保守结构域和功能位点预测

Fig. 3 Prediction of conserved domain and function sites of the differential fragment

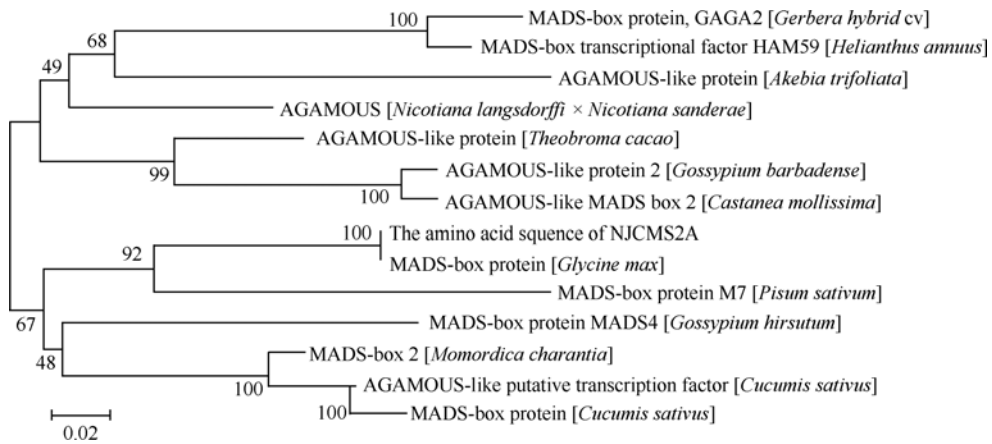


图 4 部分同源性较高的植物 MADS-box 转录因子氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of MADS-box transcription factors in some plant species

2.5 差异片段在 NJCMS2A 与 NJCMS2B 中表达的 RT-PCR 验证

用 RT-PCR 检测差异片段时, 分别用不育系 NJCMS2A 与其保持系 NJCMS2B 的花蕾 cDNA 和成熟花 cDNA 作为模板, cDNA 反转录前首先确保 RNA 的起始量一致。因为模板的浓度不同将反映在 PCR 产物在琼脂糖凝胶上条带亮度的不同, 所以在进行扩增前, 用 *actin* 引物调节模板浓度, 使模板量一致, 然后进行 RT-PCR 扩增。从图 5 可以明显看出, 该差异片段在 NJCMS2A 花蕾中表达量最高, 明显高于 NJCMS2B 花蕾中的表达量, 而且在成熟花中的表达都比在花蕾中低, 在 NJCMS2B 的成熟花中表达最低。

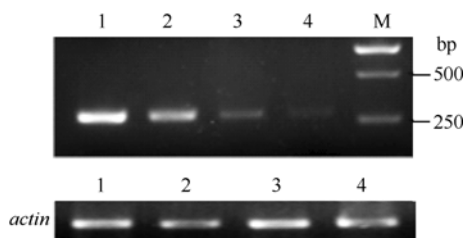


图 5 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis profile of RT-PCR

1: NJCMS2A 花蕾; 2: NJCMS2A 成熟花; 3: NJCMS2B 花蕾;

4: NJCMS2B 成熟花; M: 分子量标准 DL2000.

1: NJCMS2A flower buds; 2: NJCMS2A flowers; 3: NJCMS2B flower buds; 4: NJCMS2B flowers; M: molecular marker DL2000.

3 讨论

Coen 等^[17]提出了花发育的 ABC 模型, 认为控制花器官发育的基因按功能可以分为 A、B、C3 类, 这些基因单独或共同作用控制各轮花器官的发育。随着分子遗传学的深入研究发现, 花的发育受多个途径的调控, 并且形成一个复杂的网络。经典的花发育的 ABC 模型也被不断地改进和完善, 最终发展为 ABCDE 模型, 花器官发育的充分条件也得到相对全面的阐释^[18-19]。目前, 已发现的参与花发育调控网络的转录调控因子中有一类属于 MADS-box 基因家族, 该类基因广泛存在于动物、植物和真菌中。

胡瑞波等^[20]研究表明, Glyma13g29510 为一个参与花器官建成的 Type II MADS-box 基因, 被命名为 *GmMADS1*。 *GmMADS1* 基因为 C 类基因 *agamous* (AG), 在拟南芥中 *agamous* 基因集中在雄蕊和心皮中表达, AG 突变体的花中, 第 3 轮的雄蕊被花瓣取代, 第 4 轮的心皮被另一朵 AG 小花取代, 表明拟南

芥 AG 基因的主要功能是促进雄蕊和心皮的发育, 并且抑制 *AP₁* 基因在花的第 3 轮和第 4 轮表达^[21]。本研究所得差异片段与大豆 Gm13 上 g29510.1cDNA 片段的同源性很高, 且在不育系 NJCMS2A 中表达量很高, 而在保持系 NJCMS2B 中表达量很低, 推测该基因与大豆细胞质雄性不育可能有关。

Murai 等^[22]、Meguro 等^[23]和 Hama 等^[24]分析粗厚山羊草 (*Ae. crassa*) 细胞质的异质小麦农林 26 的雄蕊心皮化现象时发现, 该现象由 B 类 MADS-box 基因表达模式的改变引起。孙清萍等^[25]研究红莲型水稻不育系花粉发育不同时期 MADS-box 基因家族的表达差异, 发现 MADS-box 基因的表达明显受到细胞质的影响, 认为 MADS-box 基因家族参与了水稻细胞质不育和育性恢复的核质互作。袁自强等^[26]在研究水稻 MADS-box 基因与形态发生的关系时, 运用 RT-PCR 方法从水稻珍汕 97B 的幼穗中分离和克隆了两个 MADS-box 基因 *nmads1* 和 *nmads3*, 分子杂交发现处在同一发育阶段的水稻幼穗中核质互作雄性不育系珍汕 97A 比其保持系珍汕 97B 多一个特异表达的 *nmads1* 的基因产物。周琳璘等^[27]在 YS 型小麦温敏雄性不育系中找到一个可能与育性转换相关的 MADS-box 转录因子序列, 该基因在不育系的幼穗中表达量较高, 在相应保持系的幼穗中表达量较低, 表明其表达与小麦雄性不育的育性转换有关, 该基因的大量表达导致不育。本研究从大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 花蕾 cDNA 中克隆到的 MADS-box 基因片段, 在不育系 NJCMS2A 花蕾中表达量很高, 而在保持系 NJCMS2B 花蕾中表达量很低, 推测大豆细胞质雄性不育系 NJCMS2A 的不育性可能与该 MADS-box 基因的大量表达有关。

4 结论

分离得到一个差异表达片段, 它与 MADS-box 基因保守区有很高的同源性, 证明是一个 MADS-box 基因的转录因子, 在不育系 NJCMS2A 花蕾中表达量很高, 而在保持系 NJCMS2B 花蕾中表达量很低, 推测该差异片段可能与大豆细胞质雄性不育有关。

References

- [1] Bachem C W B, Van Der Hoeven R S, De Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber

- development. *Plant J*, 1996, 9: 745–753
- [2] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Iida S. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 516–521
- [3] Van Der Biezen E A, Juwana H, Parker J E, Jones J D G. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2000, 13: 895–898
- [4] Qin L, Overmars H, Helder J, Popeijus H, Van Der Voort J R, Groenink W, Van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G. An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2000, 13: 830–836
- [5] Ling X-Y(凌杏元), Zhou P-J(周培疆), Huang Q-Y(黄青阳), Guan H-X(关和新), Zhu Y-G(朱英国). Isolation and sequence analysis of a mitochondrial DNA fragment associated with CMS in Hong Lian type rice. *Acta Biol Exp Sin (实验生物学报)*, 2000, 33(2): 151–155 (in Chinese with English abstract)
- [6] Wu M-S(吴敏生), Gao Z-H(高志环), Dai J-R(戴景瑞). Studies on differential gene expression of maize (*Zea mays* L.) by means of cDNA-AFLP technique. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2001, 27(3): 339–342 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang Y-Q(王永勤), Cao J-S(曹家树), Fu Q-G(符庆功), Yu X-L(余小林), Ye W-Z(叶纨芝), Xiang X(向珣). Differential expression analysis of genic male sterility A/B lines by cDNA-AFLP in Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino). *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2003, 36(5): 557–560 (in Chinese with English abstract)
- [8] Lü S-H(吕山花), Meng Z(孟征). Gene duplication and functional diversification in the MADS-box gene family. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2007, 24(1): 60–70 (in Chinese with English abstract)
- [9] Parenicova L, De Folter S, Kieffer M, Horner D S, Favalli C, Busscher J, Cook H E, Ingram R M, Kater M M, Davies B, Angenent G C, Colombo L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell*, 2003, 15: 1538–1551
- [10] Nam J, Kim J, Lee S, An G, Ma H, Nei M. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101: 1910–1915
- [11] Michaels S D, Ditta G, Gustafson-Brown C, Pelaz S, Yanofsky M, Amasino R M. *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J*, 2003, 33: 867–874
- [12] Battaglia R, Brambilla V, Colombo L, Stuitje A R, Kater M M. Functional analysis of MADS-box genes controlling ovule development in *Arabidopsis* using the ethanol-inducible *alc* gene-expression system. *Mech Dev*, 2006, 123: 267–276
- [13] Wang X-L(汪潇琳), Chen Y-P(陈艳萍), Yu D-Y(喻德跃). Expression of the MADS-box gene *GmAGL15* in seed development of soybean. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2008, 34(2): 330–332 (in Chinese with English abstract)
- [14] Alvarez-Buylla E R, Liljegren S J, Pelaz S, Gold S E, Burgeff C, Ditta G S, Vergara-Silva F, Yanofsky M F. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J*, 2000, 24: 457–466
- [15] Bai Y N, Gai J Y. Development of a new cytoplasmic-nuclear male-sterility line of soybean and inheritance of its male-fertility restorability. *Plant Breed*, 2006, 125: 85–88
- [16] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 157–173
- [17] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31–37
- [18] Ferrario S, Immink R G H, Shchennikova A, Busscher-Lange J, Angenent G C. The MADS box gene *FBP2* is required for SEPALLATA function in petunia. *Plant Cell*, 2003, 15: 914–925
- [19] TheiBen G, Saedler H. Floral quartets. *Nature*, 2001, 409: 469–471
- [20] Hu R-B(胡瑞波), Fan C-M(范成明), Li H-Y(李宏宇), Lin C-T(林辰涛), Fu Y-F(傅永福). Analysis of MIKC-type MADS-box genes in soybean (*Glycine max*). *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2009, 7(3): 429–436 (in Chinese with English abstract)
- [21] Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1989, 1: 37–52
- [22] Murai K, Takumi S, Koga H, Ogihara Y. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *Plant J*, 2002, 29: 169–181
- [23] Meguro A, Takumi S, Ogihara Y, Murai K. *WAG*, a wheat *AGAMOUS* homolog, is associated with development of pistil-like stamens in alloplasmic wheats. *Sex Plant Reprod*, 2003, 15: 221–230
- [24] Hama E, Takumi S, Ogihara Y, Murai K. Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta*, 2004, 218: 712–720
- [25] Sun Q-P(孙清萍), Wang L(汪莉), Yi P(易平), Zhu Y-G(朱英国). Expression analysis of MADS-box gene family on uni-nucleate and bi-nucleate stage anthers on HL-CMS system. *Wuhan Bot Res (武汉植物学研究)*, 2002, 20(5): 325–328 (in Chinese with English abstract)
- [26] Yuan Z-Q(袁自强), Qian X-Y(钱晓茵), Liu J(刘军), Liu J-D(刘建东), Qian M(钱旻), Yang J-S(杨金水). cDNA cloning and analysis of two MADS-box genes in rice. *Prog Nat Sci (自然科学进展)*, 2000, 10(2): 129–134 (in Chinese)
- [27] Zhou L-L(周琳琳), Song G-Q(宋国琦), Li H-Y(李红燕), Hu Y-G(胡银岗), He B-R(何蓓如). A MADS-box transcription factor related to fertility conversion in male sterile wheat lines. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2008, 34(4): 598–604 (in Chinese with English abstract)