

羽衣甘蓝 MADS-box 基因 *BoaAGL6* 的克隆及表达分析

韩悦^{1,2}, 任洪杰^{1,2}, 翟笑雨^{1,2}, 徐启江^{1,2*}

(1.林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040; 2.东北林业大学生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *acephala*)野生型及其在选育过程中发现的 2 种花瓣数量变化的突变体品种为试材,通过 RACE 方法克隆了 *AGL6* 基因的同源基因,命名为 *BoaAGL6*,并用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 分析了 *BoaAGL6* 在 3 种不同花型的羽衣甘蓝各类花器官的表达模式。结果表明:克隆的 *BoaAGL6* 基因长 999 bp(GenBank 登录号为 KC984301),开放阅读框长 759 bp,编码 252 个氨基酸;系统发育分析表明,*BoaAGL6* 基因属于 *AGL6*-like 进化系;半定量 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 结果表明,*BoaAGL6* 基因具有较宽泛的表达区域,在不同花型的花瓣中的表达有所区别,在多瓣花型的花瓣中高丰度表达,有别于在其他 2 种花型中的中等水平。说明该基因在调控羽衣甘蓝花器官特征属性及形成过程中发挥重要作用。

关 键 词:羽衣甘蓝;花发育;MADS-box 基因;*BoaAGL6* 基因

中图分类号:S635.9 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2014)05-0487-07

Cloning and expression analysis of MADS-box gene *BoaAGL6* associated with floral development in kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

HAN Yue^{1,2}, REN Hong-jie^{1,2}, ZHAI Xiao-yu^{1,2}, XU Qi-jiang^{1,2*}

(1.The State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Harbin 150040, China; 2.College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Wild type kales (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and its two mutants which have different petals in number were used as material. One *AGL6*-homologue from conventional kale varieties denoted as *BoaAGL6* was cloned using RACE (rapid amplification of cDNA ends), then expression pattern of *BoaAGL6* in each floral organ was examined. The results showed that *BoaAGL6* contains a 759 bp open reading frame that encodes a deduced protein with 252 amino acid residues. Phylogenetic analysis indicated that *BoaAGL6* belongs to the *AGL6*-like subfamily. The result from multiple methods (semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR) revealed that the pattern of the expression of *BoaAGL6* is broader than those of their counterparts in eudicots, with different expression levels in petals, which is high in mutants with the most petals. These results suggest that *BoaAGL6* plays important roles in controlling floral organ identity and formation in kale.

Key words: kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*); flower development; MADS-box genes; *BoaAGL6* gene

花发育 MADS-box 基因在植物的花分生组织、花器官和各种营养器官中均有不同形式的时空表达模式,有着各自不同的功能。系统发育分析表明,在 12 个 II 型 MADS-box 基因亚家族中,*API*、*SEP* 和 *AGL6*(*AGAMOUS*-like 6)由于存在较近的亲缘关

系而构成 *API/SEP/AGL6* 进化系^[1-2],其中 *AGL6* 与 *SEP* 互为姊妹系;*AGL6/SEP* 与 *API* 互为姊妹系^[1]。*API* 亚家族基因在发育的花分生组织和初始的花器官原基中表达。拟南芥基因组中存在 4 个 *API*-like 基因:*API*、*FRUITFULL*(*FUL*)、*AGL79*

收稿日期:2014-05-08

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(C201016);哈尔滨市科技创新人才专项资金项目(2013RFLXJ015)

作者简介:韩悦(1989—),女,吉林吉林人,硕士研究生,主要从事植物发育研究,hanyue9488@126.com;*通信作者,qjjiangxu@126.com

和 *CAULIFLOWER (CAL)*, 其中 *API*、*FUL* 和 *CAL* 在调控花分生组织属性方面存在功能冗余^[3]。拟南芥 *SEP1/2/3/4* 基因, 主要参与调控四轮花器官的特征属性和花分生组织的确定性^[4-6]。然而, 拟南芥 *AGL6* 基因的直系同源基因 *AGL6-like* 基因的功能迄今为止还不是十分明确^[2]。但是, 也有研究表明, 在拟南芥 *35S:AGL6* 过表达株系和激活标签突变体中 *AGL6* 能够激活开花时间关键因子 *FLOWERING LOCUS C (FLC)* 和 *FLOWERING LOCUS T (FT)*^[7]; 矮牵牛的 *PhAGL6* 和 *SEP-like* 基因在调控花瓣和花药发育方面存在功能冗余^[8]。

已从裸子植物和所有主要被子植物中获得 *AGL6* 亚家族成员^[9]。*AGL6-like* 在花分生组织中的表达模式具有保守性^[10]。但是也有研究表明, 该类基因能在拟南芥及裸子植物的营养器官中表达^[11], 例如, 拟南芥 *AGL6* 在茎生叶原基和花诱导形成的潜在苞叶区表达^[12]; *PrMADS3* 在叶芽起始针叶原基的细胞群中表达, 说明在被子植物起源之前, *AGL6* 进化系具有调控营养发育的功能。随着研究的不断深入, *AGL6-like* 基因的多样性功能不断被阐释。例如, 水稻 *MFO1* 具有调控花器官属性和花分生组织确定性功能, *Mfol* 突变体小花的内稃和浆片发育不正常、花器官融合以及产生额外的花器官^[13]; 玉米的 *ZAG3* 基因在花分生组织中表达, 而在外稃和雄蕊中无表达, 在花发育的后期, *ZAG3* 在发育的浆片、内稃、心皮和内珠被中表达, 缺失突变证实该基因同样具有调控花器官属性和花分生组织确定性的功能^[14]。了解 *AGL6-like* 基因的原始功能及其多样性的分化功能, 需要扩展研究的植物范围。

羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 的花具有典型双子叶植物花的结构, 由 4 枚萼片、4 枚花瓣、6 枚雄蕊、1 枚雌蕊构成。在新品种选育过程中, 笔者获得了稳定遗传花瓣增多和花瓣减少突变体, 其萼片、雄蕊、雌蕊发育正常, 但花瓣数目增多或减少。本研究以羽衣甘蓝花芽为试材, 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得了 1 个与花发育相关的 *AGL6* 基因, 通过半定量 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 分析了 *BoaAGL6* 基因的时空表达模式, 以探讨 *BoaAGL6* 基因在羽衣甘蓝花器官

发育中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试羽衣甘蓝

羽衣甘蓝自交系 14 号 (花瓣数目正常, 4 枚)、自交系变异株羽衣甘蓝 5 号 (多瓣, 8 枚以上)、自交系变异株羽衣甘蓝 20 号 (少瓣, 0~3 枚) 品系均由东北林业大学花卉生物工程研究所提供。羽衣甘蓝种植于温室内, 常规栽培管理, 2 月中旬开始现蕾。供试 3 种材料的遗传背景相同, 除花瓣数目有差异外, 其他性状完全相同。

1.2 RNA 提取、MADS-box 同源基因克隆

使用 TRIzol (Invitrogen) 试剂提取羽衣甘蓝常规品种 14 号花芽的总 RNA, 用 NanoDrop (NanoDrop technologies) 分光光度计和琼脂糖凝胶检测总 RNA 的质量和浓度。利用 P19E (表 1)、第一链 cDNA 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司)、以 5 μg 总 RNA 为模板合成第一链 cDNA。

表 1 羽衣甘蓝 *BoaAGL6* 基因克隆及表达分析用引物

Table 1 List of primers used for cloning and expression analysis of *BoaAGL6* from kale

编号	引物名称	核苷酸序列 (5'—3')
1	P19E	GACTCGAGTGCACATCG(T) ₁₇
2	P18E	GACTCGAGTGCACATCG
3	MADS-box 基因特异简并引物	ARCTCACYGTCTYTGAYGC
4	<i>BoaAGL6</i> GSP1	CGATGCTGCCGAGTTTGG
5	<i>BoaAGL6</i> GSP2	CAGTTGCTTCACGCCCAT
6	锚定引物	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₇
7	接头引物	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
8	<i>BoaAGL6</i> -Realtime-F	ATTTCGCGTTTCAGCCTTCTC
9	<i>BoaAGL6</i> -Realtime-R	CCTTCACCTTGACGCTAGTAAT
10	<i>18S</i> -Realtime-F	AGCCTGAGAAACGGCTAC
11	<i>18S</i> -Realtime-R	CGAAGAGCCCGGTATTGTTATT

下划线标出碱基为简并碱基, 即 R 代表 A 或 G, Y 代表 C 或 T, S 代表 G 或 C, V 代表 A 或 C 或 G; F 意为正向引物; R 意为反向引物; (T)₁₇ 示 17 个 T 碱基, 可以与 polyA 尾锚定。

利用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 法克隆 3'-cDNA 序列, 根据 GenBank 中与羽衣甘蓝亲缘关系相近物种的 MADS-box 基因保守区的核苷酸序列设计 MADS-box 基因特异简并引物 (表 1)。以第一链 cDNA 为模板, 利用 MADS-box 基因特异简并引物、

P18E 引物(表 1)、TransTaqTMHIFI DNA 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司)进行 PCR 扩增。扩增条件为:94℃预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒(Genestar)回收后用 T 载体克隆, 送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

根据获得的 3'-cDNA 序列设计引物 *BoaAGL6GSP1*、*BoaAGL6GSP2*(表 1), 利用 *BoaAGL6GSP1* 和锚定引物以加 dA 尾的 cDNA 为模板进行 5'-RACE 扩增。为保证克隆片段的特异性, 再用巢式引物 *BoaAGL6GSP2* 和接头引物进行第二次 5'-RACE 扩增, 克隆 5'-cDNA 序列, PCR 产物的回收纯化、克隆、测序同 3'-RACE 产物。

1.3 序列比对及系统发育分析

为明确本研究分离基因所属的 MADS-box 亚家族, 将克隆的基因序列提交到 GenBank 数据库中, 获得与克隆基因序列高度相似的同源基因, 然后用 ClustalX1.83 软件进行序列比对, 用 GeneDoc3.2 软件进行手工调整, 并且将核苷酸序列转换为氨基酸序列。用 MEGA6 软件^[15]的邻位相连法(Neighbor-joining, NJ)对氨基酸矩阵进行系统发育分析。NJ 系统树分支的置信度采用重复抽样分析的方法, 重复抽样的次数为 1 000 次, 大于 50%的 bootstrap 标注在树图上。

1.4 基于半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 的 *BoaAGL6* 基因表达分析

提取 3 种花型的萼片、第一轮花瓣、第二轮花瓣、雄蕊、心皮、子房的总 RNA。以各类花器官的总 RNA 为模板, 利用 oligo(dT)引物反转录合成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板进行基因特异性 PCR, 以 18S 基因为内参。

半定量 RT-PCR 在 PE-9700 型 PCR 仪上进行, 所用引物为 *BoaAGL6-Realtime-F*、*BoaAGL6-Realtime-R*(表 1)。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 25 个循环(94℃ 预变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s); 72℃ 终延伸 7 min。用 0.8%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。

用 7500 fast 型实时荧光定量 PCR 仪和 Power SYBR[®] Green PCR Master MiX 试剂盒 (Applied Biosystems)以上述花器官的 cDNA 为模板进行 *BoaAGL6* 基因的实时定量 PCR 分析; 20 μL 反应体系中包括 8.4 稀释的第一链 cDNA 模板(1 μg cDNA 加 420 μL 水稀释)、浓度为 10 μmol/L 的引物、*BoaAGL6-Realtime-F*、*BoaAGL6-Realtime-R* 各 0.8 μL、Power SYBR[®] Green PCR Master MiX(2×)10 μL。反应程序如下: 95℃ 预变性 2 min; 随后 40 个扩增循环(95℃ 10 s, 60℃ 45 s)。以 18S 基因的转录表达水平为内参, 采用 2^{-CT} 法^[16]分析 *BoaAGL6* 基因的相对表达水平。每个样品设 3 个生物学重复, 在同一批次内完成内参基因和目标基因的 PCR 反应。

2 结果与分析

2.1 羽衣甘蓝花器官特征基因 *BoaAGL6* 的克隆及序列比对

3'-RACE 得到的测序结果表明, 该片段有效长度为 841 bp, 其核苷酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AGL6* 基因核苷酸序列具有 87%的相似性, 为 *AGAMOUS-like 6 (AGL6)* 基因, 因而将从羽衣甘蓝中克隆的 *AGL6* 基因命名为 *BoaAGL6*。

以 3'-RACE 序列为基础设计引物进行 5'-RACE 扩增, 克隆后测序结果表明, 该片段长度为 405 bp, 在 5'端 36 bp 处发现起始密码子。拼接测序结果, 得到长度为 999 bp 的 *BoaAGL6* 基因 cDNA 序列。GenBank 登录号为 KC984301。其开放阅读框长 759 bp, 编码 252 个氨基酸, 含有 56 个氨基酸的 MADS 结构域、33 个氨基酸的 I 结构域、77 个氨基酸的 K 结构域、86 个氨基酸的 C 结构域(图 1)。

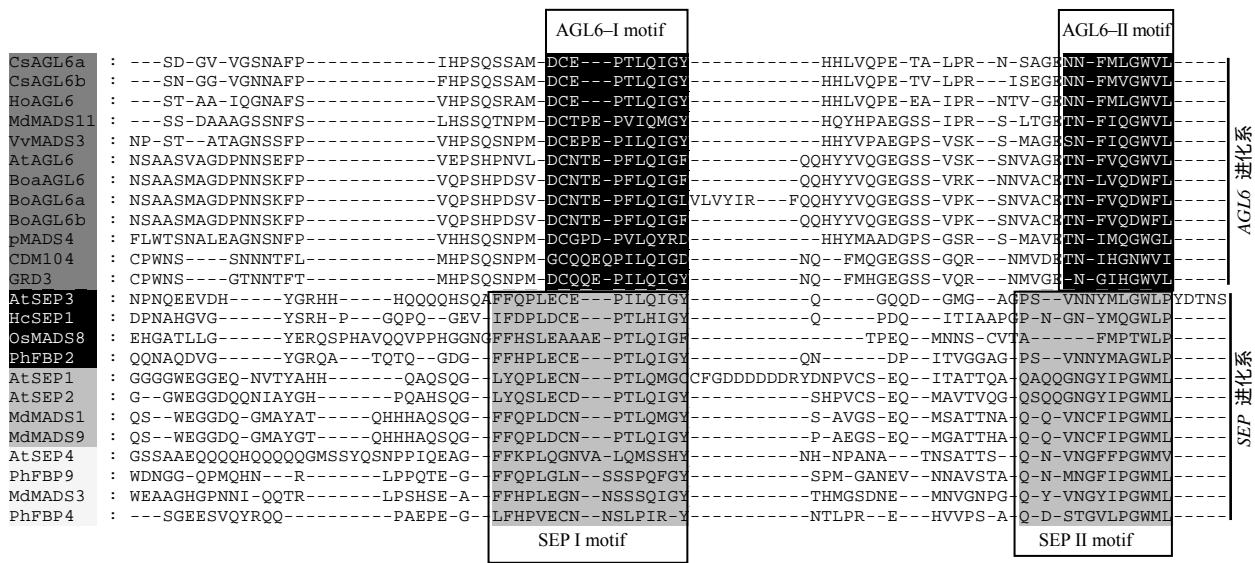
与其他 MADS-box 蛋白的多重氨基酸序列比对结果表明, *BoaAGL6* 蛋白拥有典型的 MIKC-type 结构(图 1), 与 VvMADS3(葡萄)、AtAGL6(拟南芥)、BoAGL6a(花椰菜)和 BoAGL6b(花椰菜)等具有较高的序列相似性。在 AGL6-like 蛋白 C-末端有 2 个高度保守的基序 AGL6-I motif 和 AGL6-II motif^[17](图 2), 与 SEP I/II motifs 高度相似, 有潜在的转录激活活性^[13]。

1 TAAGACATCGGAGACAAGAAAAAGGAGAGAGAAAATATGGGAAGAGGAGAGTGGAGATGAAGAGGATAGAGAACAAAATCAATAGGCAG 18
M G R G R V E M K R I E N K I N R Q
91 GTGACCTTCTCAAAAAGAGAAATGGTTTGTGAAGAAAGCTTATGAGCTCTCTGTCTGTGATGCTGAAGTTGCTCTCATGCTCTTC 48
V T F S K R R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L I V F
181 TCTAGCCGTGGCAAGCTCTACGAGTTCGGCAGTTCGGAGTTGAAGAACTATGAACGGTATCATCGTTGCTACAACCTGTTCTGTGACC 78
S S R G K L Y E F G S V G V E R T I E R Y H R C Y N C S V T
271 AATAATAGGCTGAAGAGTCTAAACAGAACTGGTGTGAGGAGTGGCAAGCTGAAAGCCAATACGAATCGCTTGTGCGACTAATAGG 108
N N R P E E S K Q N W C Q E V A K L K A K Y E S L V R T N R
361 CATTGTCTTGAGAGATATGGAGAAATGGGCGTGAAGCACTGCAAGCGTTGGAGCGGAGCTGGAAGCAGCTCTTACTGCGACTCGA 138
H L L G E D I G E M G V K Q L Q A L E R Q L E A A L T A T R
451 CAACGGAAGACACAAGTTATGATGGAAGAAATGGAAGATCTTCGAAAAAGGAGCGCAACTCGGAGACATAAACAACAACCTCAAGATT 168
Q R K T Q V M M E E M E D L R K K E R Q L G D I N K Q L K...I
541 AAGTTTGAAGCGGAGGCCATGCTTTCAATCCTTCAAGACTTTCGCAAACTCGGCAGCATCGATGGCGGTGATCTCAACAATCT 198
K F E A G G H A F K S F Q D F W P N S A A S M A G D P N N S
631 AAATTTCCGGTTCAGCTTCTCATCTGATTCAGTGGATTGCAACACCGAACCTTTTACAATAGGGTTCCAACAACATTACTACGTG 222
K F P V Q P S H P D S V D C N T E P F L Q I G F Q Q H Y Y V
721 CAAGGTGAAGGCTTCGGTACGAAAGAATAATGTGCATGTGAGACTAATCTCGTCCAAGATTGGTTTCTTGACCTTTGTGACTAG 252
Q G E G S S V R K N N V A C E T N L V Q D W F L *
811 ATCAGCATGCCAGTGTCACTCCGAGTCCAGCTCTTAAGTTGGATTCTTAATAGAATTGTTTTTTTATAAGAAAACTTATGTTCT
901 AGAGTTTATCACTGGTGCAGATTCGTGTGAATGATTTCGCAGTATGGGTTCCCTAAACATTTTAACACGCTGTTTTTCTAAAAAAA
991 AAAAAAAA

“—” “—” “~” “...” 分别示 M、I、K、C 结构域；左右两侧的数字分别示核苷酸及氨基酸位置。

图1 羽衣甘蓝BoaAGL6 cDNA的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of BoaAGL6 cDNA from kale



CsAGL6a~GRD3 为 AGL6 组；AtSEP3~PhFBP2 为 SEP3 组；AtSEP1~MdMADS9 为 SEP1、2 组；AtSEP4~ PhFBP4 为 SEP4 组

图2 部分AGL6和SEP基因的氨基酸序列

Fig. 2 Sequence alignment of amino acid sequences among several AGL6-like and SEP-like genes

2.2 *BoaAGL6* 基因与其他 MADS-box 基因的系统发育关系

AGL6-like 基因是 MADS-box 中重要的亚家族之一，据报道它与 *SEP* 和 *API* 亚家族亲缘关系较近^[18]。为确定羽衣甘蓝 *BoaAGL6* 基因的系统发育位置，从 GenBank 数据库中收集了 71 个 *AGL6* -like 类、*SEP*-like 类、*API* 类亚家族 MADS-box 基因用于系统发育树的构建。对 M、I、K、C 区的氨基酸

序列进行 NJ 分析而构建的系统发育树(图 3)表明，相同物种的 *AGL6* 同源蛋白具有较高的自展支持率，*BoaAGL6* 被归入 *AGL6* 同源蛋白单元组，并与真双子叶植物拟南芥 *AGL6* 与 *AGL13*(M55554、U20183)、花椰菜 *BoAGL6a* 与 *BoAGL6b*(AJ508055、AJ508409)、鳞茎毛茛 *RbAGL6*(AY306184)、葡萄 *VvMADS3*(AF373602)等聚为一支，属于 *euAGL6* 进化系。

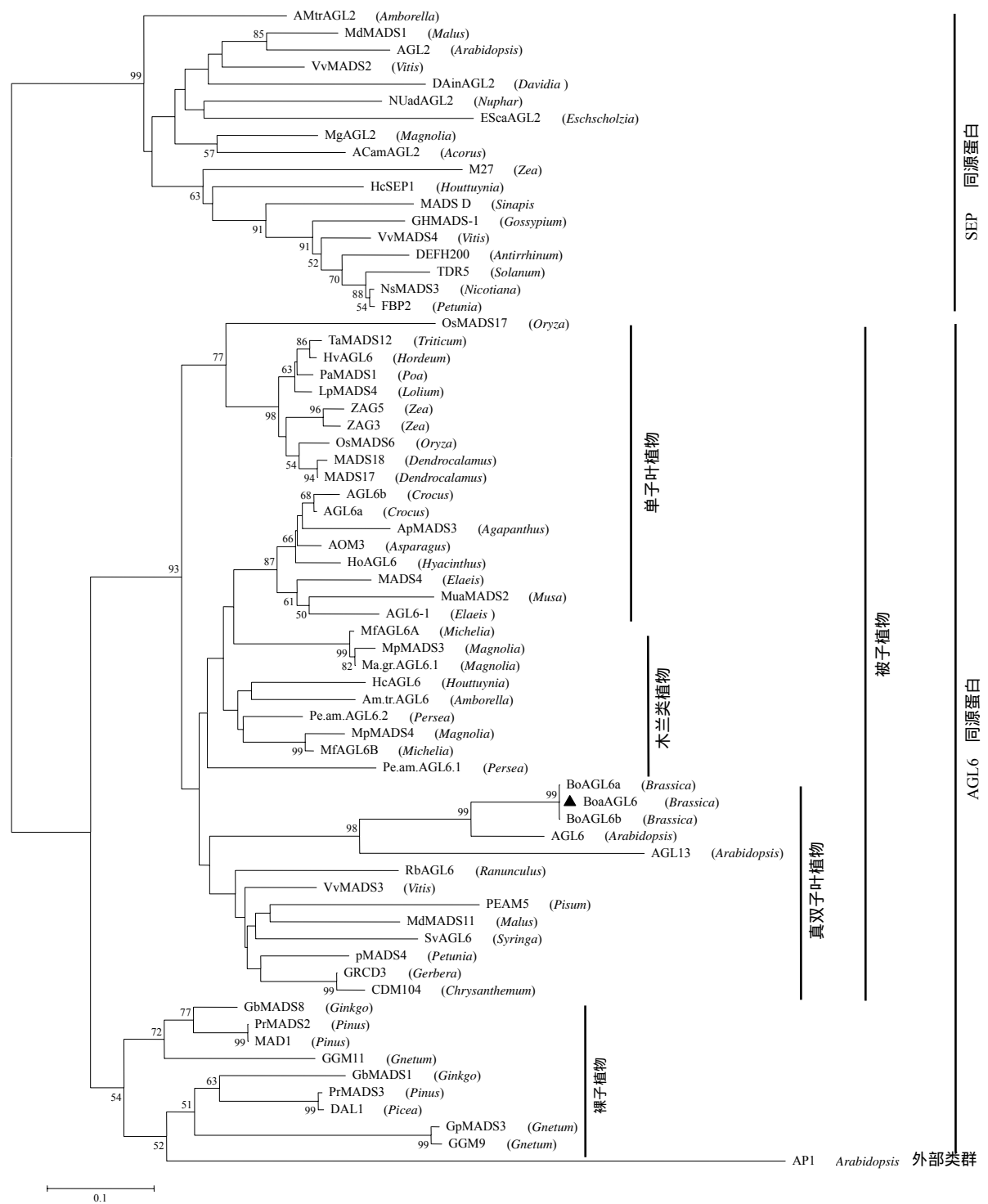
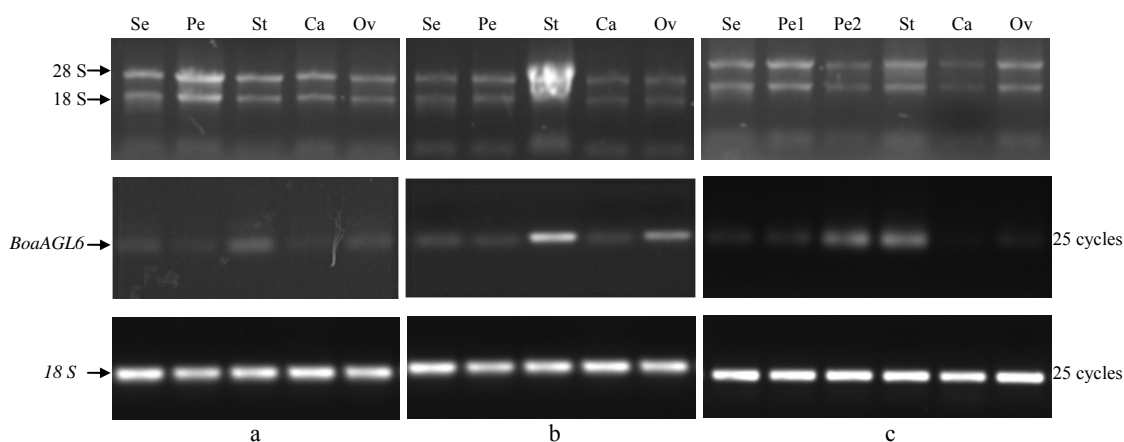


Fig. 3 The phylogenetic tree of AGL6-like MADS-box proteins generated using the Neighbor-joining method

2.3 *BoaAGL6* 基因在羽衣甘蓝各花器官中的表达模式

半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 结果表明，羽衣甘蓝 *AGL6*-like 基因 *BoaAGL6* 特异地在花器官中表达(图 4)。3 种花型中，在雄蕊、子房中高丰度表

达，在萼片和雌蕊中表现为弱表达量。在自交系变异株羽衣甘蓝 5 号的第二轮花瓣中 *BoaAGL6* 的表达明显高于羽衣甘蓝自交系 14 号和自交系变异株羽衣甘蓝 20 号。



Se、Pe、St、Ca、Ov 分别示萼片、花瓣、雄蕊、心皮、子房；a、b、c 分别为正常型(14 号)、少瓣型(20 号)、多瓣型(5 号)花器官的半定量 RT-PCR 分析结果。

图4 羽衣甘蓝 *BoaAGL6* 基因的半定量 RT-PCR 结果

Fig.4 Quantification of expression levels of the *BoaAGL6* gene in deferent floral organs of kale as determined by gene-specific semi-quantitative RT-PCR

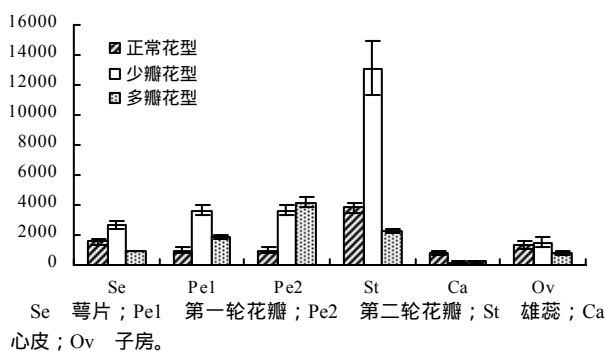


图5 羽衣甘蓝 *BoaAGL6* 基因的 qRT-PCR 分析结果

Fig. 5 Quantification qRT-PCR analysis of the *BoaAGL6* gene in kale

3 讨论

1) *BoaAGL6* 基因的归属。系统发育分析表明, MADS-box 基因家族中的 *AGL6* 亚家族在其系统发育史中经历了 5 次基因复增事件。前 2 次基因复增事件分别发生在百合目和天门冬目产生之前;在木兰类植物分化期间发生第 3 次重增;第 4 次重增事件发生在核心真双子叶植物起始之前,产生了 *euAGL6* 和 *AGL6*-like 基因^[2]。*AGL6* 亚家族的系统发育史可以追溯到核心真双子叶植物起源之时,这表明核心真双子叶植物的 *AGL6* 祖先基因通过基因组复制而产生多个旁系同源基因,其中发挥转录因子功能的旁系同源基因被优先保存下来^[1,19]。此外, MADS-box 基因也可以通过多次独立的复制事件而产生旁系同源基因。在被子植物中, *euAGL6* 进化系的数量远多于 *AGL6*-like 进化系的数量^[2,12]。羽衣甘蓝中只存在 *euAGL6* 基因即 *BoaAGL6* 基因。

BoaAGL6 蛋白的 C-末端具有该进化系典型性的 *AGL6*-I motif 和 *AGL6*-II motif。系统发育分析表明,采用不同的外部类群(*SOC1* 类和 B 类)和不同的计算方法(ML 法和 Mrbayes 法)所得到的基因树的拓扑结构基本一致, E 类和 *AGL6* 类为姊妹类群,而 A 类基因是这两类基因的姊妹类群。*AGL6* 蛋白 C 末端的 2 个 motif 和 SEP 类蛋白 C 末端的两个 motif 更为相近, SEP 类和 *AGL6* 类蛋白在 K3 区拥有共同的 PRODOM 结构域(PD352768)。

2) *BoaAGL6* 基因的表达模式。*AGL6* 世系在花分生组织中的表达自被子植物多样化以来就是保守的^[2]。本研究结果表明 *AGL6* 与 *SEP* 互为姊妹系^[1]。*BoaAGL6* 在所有的花器官中都表达,说明 *BoaAGL6* 基因参与了所有花器官的属性决定,与“ABCE”模型^[20]中 E 功能基因的表达范围相符。在雄蕊与子房中表达最高,而在 3 种花瓣数量不同的花型中,在多瓣花的第二轮花瓣中, *BoaAGL6* 的表达明显高于野生型和少瓣突变体,依照“ABCE”模型推测,花瓣变化的表型可能是与 A、B、E 功能基因表达发生改变或是由于 C 功能基因表达区域的变化有关。根据实验结果,可推测 *BoaAGL6* 在一定程度上影响羽衣甘蓝突变体花瓣的变化。下一步需要克隆羽衣甘蓝其他 A、B、C、E 基因,探讨其构成的分子网络在花瓣变化的羽衣甘蓝表型中的整体功能。

参考文献:

[1] Zahn L M, Kong H, Leebens-Mack J H, et al. The

- evolution of *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes :A preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history[J]. *Genetics*, 2005, 169(4): 2209–2223.
- [2] Viaene T, Vekemans D, Becker A, et al. Expression divergence of the *AGL6* MADS domain transcription factor lineage after a core eudicot duplication suggests functional diversification[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 148. DOI: 10.1186/1471-2229-10-148.
- [3] Ferrandiz D, Gu Q, Martienssen R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*[J]. *Development*, 2000, 127(4): 725–734.
- [4] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes[J]. *Nature*, 2000, 405(6783): 200–203.
- [5] Pelaz S, Gustafson Brown C, Kohalmi S E, et al. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development[J]. *Plant Journal*, 2001, 26(4): 385–394.
- [6] Ditta G, Pinyopich A, Robles P, et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity[J]. *Current Biology*, 2004, 14(21): 1935–1940.
- [7] Yoo S K, Wu X, Lee J S, et al. *AGAMOUS - LIKE 6* is a floral promoter that negatively regulates the *FLC/MAF* clade genes and positively regulates *FT* in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(1): 62–76.
- [8] Rijpkema A S, Zethof J, Gerates T, et al. The petunia *AGL6* gene has a *SEPALLATA*-like function in floral patterning[J]. *Plant Journal*, 2009, 60(1): 1–9.
- [9] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants[J]. *Mol Phy Evol*, 2003, 29(3): 464–489.
- [10] Yoo M J, Soltis P S, Soltis D E. Expression of floral MADS-box genes in two divergent water lilies: *Nymphaeales* and *Nelumbo*[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2010, 171(2): 121–146.
- [11] Reinheimer R, Kellogg E A. Evolution of *AGL6*-like MADS-box genes in grasses (*Poaceae*): Ovule expression is ancient and palea expression is new[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2591–2605.
- [12] Schauer S E, Schlüter P M, Baskar R, et al. Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of *AGAMOUS-LIKE6* subfamily members in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(6): 987–1000.
- [13] Ohmori S, Kimizu M, Sugita M, et al. *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.
- [14] Thompson B E, Bartling L, Whipple C, et al. Bearded-ear encodes a MADS-box transcription factor critical for maize floral development[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2578–2590.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [17] Wang B G, Zhang Q, Wang L G, et al. The *AGL6*-like Gene *CpAGL6*, a potential regulator of floral time and organ identity in Wintersweet (*Chimonanthus praecox*)[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011, 30(3): 343–352.
- [18] Kim S, Soltis P S, Soltis D E. *AGL6*-like MADS-box genes are sister to *AGL2*-like MADS-box genes[J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56(5): 315–325.
- [19] De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y. Genome duplication and the origin of angiosperms[J]. *Trends Ecol Evolut*, 2005, 20(11): 591–597.
- [20] Litt A, Kramer E M. The ABC model and the diversification of floral organ identity[J]. *Seminars in cell and developmental biology*, 2010, 21(1): 129–137.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维