

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201707001

引文格式: 廖望, 闫晓雪, 吴军, 等. 麻疯树雌雄花中 MADS-BOX 基因的表达分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(2):180-187

LIAO W, YAN XX, WU J, et al. Expression analysis on MADS-BOX genes in male and female flowers of *Jatropha curcas* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(2):180-187

麻疯树雌雄花中 MADS-BOX 基因的表达分析

廖望, 闫晓雪, 吴军, 陈放*

(四川大学 生命科学学院, 成都 610041)

摘要: 麻疯树 (*Jatropha curcas*) 种子含油率高, 种子中的油类物质可作为生物柴油被开发和利用, 是极具潜力的生物质能源树种之一。麻疯树雌雄异花, 在自然条件下雄花数量通常远远大于雌花, 这大大限制了种子和油的产量, 因此开展麻疯树性别分化与花发育分子机理的研究具有重要意义。该研究选取 10 个麻疯树的 MADS-BOX 基因 (*JcAGL1*, *JcAGL6*, *JcAGL9*, *JcAGL11*, *JcAGL15*, *JcAGL61-3*, *JcAGL62-1*, *JcAGL62-6*, *JcAGL62-7*, *JcAGL80-2*), 提取麻疯树早期发育各个阶段的雌雄花总 RNA, 并反转录成 cDNA, 采用实时荧光定量方法, 探索早期发育不同阶段的麻疯树雌雄花目的基因的表达情况。结果表明: 目的基因在发育起始的雌雄花中的表达具有差异, 比如 *JcAGL6* 和 *JcAGL15* 在雄花中表达量要高于雌花, 而 *JcAGL1*, *JcAGL9* 和 *JcAGL11* 在雌花中的表达量要高于雄花, 这说明花原基中目的基因表达会直接或间接决定性别分化的方向; 在之后的发育过程中, 目的基因的表达情况在雌雄花中有所不同; 随着花的发育, 目的基因在雌雄花中的表达量变化存在差别, 这反应出麻疯树雌雄花发育中目的基因表达模式上的差异; 另外, 也能看出在此过程中各个目的基因又发挥着不同的功能。该研究结果为进一步探究麻疯树雌雄花发育相关基因的表达提供了理论依据, 为了解麻疯树性别分化和花发育的分子机理奠定了基础。

关键词: 麻疯树, MADS-BOX 基因, 性别分化, 花发育, 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q945.4, Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)02-0180-08

Expression analysis on MADS-BOX genes in male and female flowers of *Jatropha curcas*

LIAO Wang, YAN Xiaoxue, WU Jun, CHEN Fang*

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The members of the MADS-BOX transcription factor family play essential roles in sex differentiation and flower development in many plants. *Jatropha curcas* is a monoecious plant, which has been seen as one of the potential biomass energy tree species because oil content in the seeds is high and it can be used as biodiesel. However, seed oil production is mainly depended on seed yield, which is restricted by the low ratio of female flowers to male flowers. So the number of female flowers is one of the key factors to increase seed yield, and it is of great significance to analyze the

收稿日期: 2017-09-04

基金项目: 国家自然科学基金(31270359) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270359)].

作者简介: 廖望(1992-), 男, 四川仁寿人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究, (E-mail) leostrovsky@163.com。

* 通信作者: 陈放, 博士, 教授, 从事资源植物发育与分子生物学、植物天然产物利用、能源植物等研究, (E-mail) chenfang@scu.edu.cn。

causes of the differences in the number of female and male flowers and to study the molecular mechanisms of sex differentiation and flower development in *J. curcas*. In order to investigate the molecular mechanisms of sex differentiation and flower development, we chose ten members of MADS-BOX family gene in *J. curcas* (*JcAGL1*, *JcAGL6*, *JcAGL9*, *JcAGL11*, *JcAGL15*, *JcAGL61-3*, *JcAGL62-1*, *JcAGL62-6*, *JcAGL62-7*, *JcAGL80-2*), total RNA were extracted from female and male flowers at different stages of early developments, cDNA were synthesized by using these RNA, and qRT-PCR method was used to detect and analyze the expression of these genes in female and male flowers. The results were described as below: The expression of target genes was different between pistillate and staminate at the beginning of development, for example, the expression of *JcAGL6* and *JcAGL15* in staminate flowers was higher than that in pistillate flowers, while the expression of *JcAGL1*, *JcAGL9* and *JcAGL11* in pistillate flowers was higher than that in staminate flowers, showing that the expression of target genes in floral primordia directly or indirectly determines the direction of sex differentiation. Expression level of target genes was different between pistillate and staminate flowers in later development: With flowers development, the variation of target genes expression in pistillate and staminate flowers was different, indicating different expression patterns of target genes between pistillate and staminate flowers. In addition, it can be seen that each target gene has different functions in the process. Our results provide theory evidence to further study the expression of genes related to the development of pistillate and staminate flowers, and lay the foundation for understanding the molecular mechanism of sex differentiation and flower development in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*, MADS-BOX genes, sex differentiation, flower development, qRT-PCR

麻疯树 (*Jatropha curcas*) 为大戟科麻疯树属植物, 多年生木本, 原产于美洲热带地区, 在我国也有分布 (中国科学院植物研究所, 1979)。麻疯树种子含油率高, 可用于生产生物燃油而得到广泛关注 (Bahadur et al, 2013); 麻疯树种子中还含有蛋白质、多肽、萜类和一些小分子物质, 如种仁中含有一类核糖体失活蛋白 (curcin), 可能具有抗肿瘤作用 (Lin et al, 2003); 另外, 植株中的一些活性成分还可以用于杀虫和抑菌 (Wei et al, 2004)。因此, 麻疯树在生产生物燃油的同时, 还可开发出不同种类的医药产品, 具有较好的发展前景。

麻疯树属雌雄同株异花植物 (Negussie et al, 2014) 为二歧聚伞花序, 一个花序上雌雄花的比值为 1 : 10 ~ 1 : 20 (郭承刚等, 2007; 何亚平等, 2008)。种子的产量是麻疯树产业发展的关键 (Chikara & Jaworsky, 2007), 而麻疯树雄花的数量远远多于雌花则极大地限制了种子的产量。因此, 分析造成麻疯树雌雄花数量差异的原因以及开展麻疯树性别分化与花发育分子机理的研究对该产业的发展具有重要意义。

MADS-BOX 蛋白家族在植物性别分化和花发育上起着十分重要的作用 (Smaczniak et al, 2012)。

MADS-BOX 家族蛋白是一类重要的转录因子 (Pellegriani et al, 1995; Huang et al, 2000), 该类蛋白的特点是在 N 端含有一段比较保守的 MADS 结构域。MADS-BOX 蛋白因在结构上的差异分为两类: I 型 (Type I) 和 II 型 (Type II)。I 型只含有一段 MADS-BOX 区域 (De Bodt et al, 2003; Kofuji et al, 2003; Parenicová et al, 2003), 而 II 型除了 N 端含有 MADS-BOX 区域外, 通常在其下游还具有 I (intervening) 和 K (keratin-like) 区域, 此外在其 C 端还含有一段高度可变的区域, 这四个区域统称为 MIKC 结构 (Kaufmann et al, 2005), 所以 II 型又被称为 MIKC 型 (MIKC-type)。I 型往下又可分为 $M\alpha$ 、 $M\beta$ 、和 $M\gamma$ 三个亚族; II 型又可分为 $MIKC^C$ 型和 $MIKC^*$ 型两种 (Henschel et al, 2002)。目前, 对于 I 型的研究比较少, 只在拟南芥中有部分报道 (Köhler et al, 2003, 2005; Portereiko et al, 2006; Yoo et al, 2006; Bemer et al, 2008; Colombo et al, 2008; Kang et al, 2008; Steffen et al, 2008), 其具体功能并不是十分清楚。II 型 MADS-BOX 蛋白研究得比较多, 具体功能在许多植物中也得到证实, II 型 MADS-BOX 蛋白与植物性别分化以及花发育有关并且也参与植物其他的生理生化反应 (黄方等,

2012)。在花发育 ABCDE 模型中,参与花发育的基因分为 ABCDE 五类,除 A 类中 AP2 之外,其余证实均为 MADS-BOX 家族蛋白(Wollmann et al, 2010),可见其在花发育中所起的重要作用。

本研究通过 RT-PCR 技术对麻疯树的 10 个 MADS-BOX 基因在雌雄花早期发育的不同阶段的表达情况进行分析,初步探究这些基因与麻疯树雌雄花发育的关系,为深入了解麻疯树的性别分化与花发育的分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料来源于四川省西昌市金河乡(26°56' N, 101°68' E)自然生长的麻疯树,于 5—7 月期间采集麻疯树的花序。为保证结果的可靠性,每株麻疯树只采集 1 个花序,共采集 20 个;根据 Wu et al(2011)对麻疯树雌雄花发育阶段的描述,将花发育过程分成三个阶段(第一阶段、第二阶段、第三阶段),通过体式显微镜(Olympus, SZ2)观察,在花序上筛选到第一、第二、第三阶段的雌雄花(图 1),所取材料立即放入液氮,带回实验室于 -80 °C 保存待用。

1.2 方法

选取 10 个基因进行表达分析,分别为 AGAMOUS-like 1(*JcAGL1*, Gene ID: 105629543), AGAMOUS-like 6(*JcAGL6*, Gene ID: 105643077), AGAMOUS-like 9(*JcAGL9*, Gene ID: 105644835), AGAMOUS-like 11(*JcAGL11*, Gene ID: 105635126), AGAMOUS-like 15(*JcAGL15*, Gene ID: 105628766), AGAMOUS-like 61-3(*JcAGL61-3*, Gene ID: 105634538), AGAMOUS-like 62-1(*JcAGL62-1*, Gene ID: 105631663), AGAMOUS-like 62-6(*JcAGL62-6*, Gene ID: 105639905), AGAMOUS-like 62-7(*JcAGL62-7*, Gene ID: 105644754), AGAMOUS-like 80-2(*JcAGL80-2*, Gene ID: 105636743)。通过 NCBI 数据库获得这 10 个基因所编码蛋白的氨基酸序列,利用 DNAMAN6.0 软件对这 10 个蛋白质进行氨基酸序列对比,NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进一步分析蛋白质所具有的蛋白质保守结构域,确

认这 10 个基因均为 MADS-BOX 家族基因。

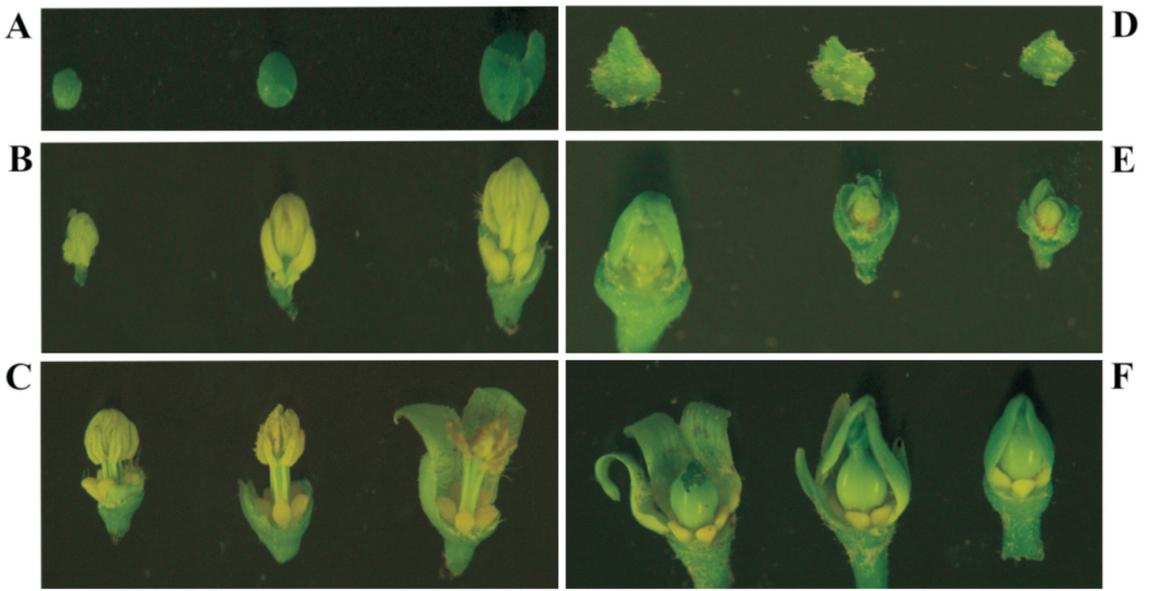
1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 的获得 使用 TaKaRa MiniBEST 植物 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 大连)分别提取三个发育阶段麻疯树雌雄花的总 RNA。用 1%琼脂糖凝胶做电泳检测 RNA 完整性,接着用 Nanovue 分光光度计(Healthcare Bio-Sciences AB, 瑞典)检测 260/280nm 和 260/230nm 下的吸光值以预估 RNA 的纯度,只有 OD_{260/280} 为 1.9 ~ 2.1, OD_{260/230} 大于 2.0 的样品才能用于后续试验。

使用 PrimeScript™ RT reagents Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa, 大连)对所提取的 RNA 进行反转录:按照试剂盒说明书,先对样品进行去基因组 DNA 反应,之后再行反转录反应获得 cDNA 并于 -20 °C 保存待用。

1.2.2 目的片段的普通 PCR 扩增 根据 Karuppaiya et al(2017)对麻疯树内参基因的筛选,选取 EF(Elongation factor 1-alpha)作为本实验的内参基因,按照定量 PCR 引物设计原则,利用 Primer Premier 6 软件设计这 11 个基因的定量 PCR 引物(表 1),所有引物均由华大基因合成。

随机选择某一时期的雌雄花的 cDNA 作为模板用以上引物进行普通 PCR 反应,反应体系 20 μL,其中 2 × TSINGKE Master Mix(blue)(TSINGKE, 北京)10 μL,模板、正向引物、反向引物各 1 μL, ddH₂O 7 μL;普通 PCR 反应程序如下:94 °C 5 min;94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 15 s, 共 35 个循环;72 °C 10 min;12 °C 保存。PCR 反应结束后,用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 目的基因的定量检测 采用 CFX Connect system(Bio-Rad)对三个时期雌雄花的目的基因进行 RT-PCR 检测,反应体系 25 μL,其中的组分为 2 × SYBR © Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)12.5 μL,正向引物(10 μmol · L⁻¹)1 μL,反向引物(10 μmol · L⁻¹)1 μL, cDNA 1 μL, RNase Free ddH₂O 9.5 μL。以无模板体系作为对照组,每个样品 3 个重复,按如下反应程序进行 RT-PCR 反应:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s, 60 °C 30 s, 每个循环结束后均会对荧光信号进行采集,共 40 个循环;65 °C 开始,以每步 0.5 °C 的速度升高至 95 °C,每个温度维持 5 s 时间采集信号,取溶解曲线为单



注: **A.** 第一阶段雄花; **B.** 第二阶段雄花; **C.** 第三阶段雄花; **D.** 第一阶段雌花; **E.** 第二阶段雌花; **F.** 第三阶段雌花。

Note: **A.** Male flowers in the first stage; **B.** Male flowers in the second stage; **C.** Male flowers in the third stage; **D.** Female flowers in the first stage; **E.** Female flowers in the second stage; **F.** Female flowers in the third stage.

图 1 不同发育阶段的雌雄花

Fig. 1 Early flower developmental stages

表 1 普通 PCR 以及 qPCR 所用引物

Table 1 Primers for normal PCR and real-time quantitative PCR reactions

目标基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增片段 长度 Product length (bp)
Elongation Factor	F:GTCTGTGAGATGCACCATGAAG R:TAGAGGCCAACAAAACCACGTTTC	108
AGAMOUS-like 1	F:ACAGGAGCAGCAACAGCAACAG R:TGGGCGAGAGTAATGGTGATTGG	133
AGAMOUS-like 6	F:TCTGTCTCTGCGATGCTGAAGTTG R:AGCTCTGTCTCACCCTCAATGCT	157
AGAMOUS-like 9	F:TGACTGATCTACAACGCAAGGAACA R:TGAAAGAAACCATGCCCTGAGG	166
AGAMOUS-like 11	F:AGAGGATAGAGAACACAACGAATCG R:CACGGCTGGAGAAGACAATGAG	129
AGAMOUS-like 15	F:GCAAACAGCAGGCAAGTTACATTCT R:ATAACAGCAACCTCAGCATCACAGA	98
AGAMOUS-like 61-3	F:TTCATTCGGTCAACCCAGAAGTCC R:CGATTAAGTGCTGGCTGATGGAGTT	89
AGAMOUS-like 62-1	F:CGGTAATCCTCTTCTCCGAGCAT R:CGGTCACAGCACTACTACTACT	147
AGAMOUS-like 62-6	F:AAGCGACTTGTGGAACCTCAGATTTC R:TTCACGAGGAGGAGCACCAATTC	111
AGAMOUS-like 62-7	F:CGAAGACGAGCCGACGACCTTA R:ACTCCTTCACTGCCTCCTCATACTC	98
AGAMOUS-like 80-2	F:ACTCTTTGTGGGGTTGTTGC R:AGGGAGAAGGCCAAACATCT	76

峰的数据,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) 法对数据进行处理,得到相对表达结果,用 GraphPad Prism 5 软件绘制柱形图。

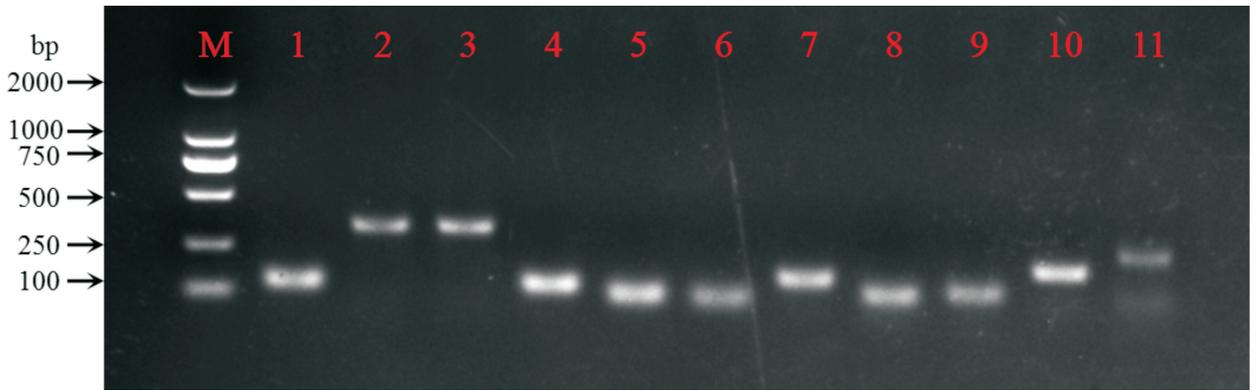
2 结果与分析

2.1 目的片段的扩增

对提取的总 RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳和质量检测,图 2 结果显示 $OD_{260/280}$ 均在 1.9~2.1 之间且 $OD_{260/230} > 2.0$,说明 RNA 质量符合后续实验要求。以设计的目的基因以及内参基因 EF 引物对 cDNA 进行普通 PCR 扩增,经测序和 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示均得到预期的目的片段。

2.2 麻疯树雌雄花早期不同阶段目的基因的定量分析

qPCR 结果如图 3 所示, *JcAGL1* 和 *JcAGL9* 基因在雌雄花中表达状况相似,在雌花早期发育的第一阶段有相对比较高的表达,随后花发育时期进入第二阶段直至第三阶段表达量逐渐下降;但两个基因在雄花发育初期表达量相对较低,且随着花的发育,表达量逐渐上升。 *JcAGL6* 无论是在雌花还是雄花中,随着花发育均呈现逐渐下降的



注: M. 分子量标准; 1. *JcAGL1* 扩增结果; 2. *JcAGL6* 扩增结果; 3. *JcAGL9* 扩增结果; 4. *JcAGL11* 扩增结果;
5. *JcAGL15* 扩增结果; 6. *JcAGL61-3* 扩增结果; 7. *JcAGL62-1* 扩增结果; 8. *JcAGL62-6* 扩增结果;
9. *JcAGL62-7* 扩增结果; 10. *JcAGL80-2* 扩增结果; 11. *EF* 扩增结果。

Note: M. Molecular standard; 1. Result of *JcAGL1* amplification; 2. Result of *JcAGL6* amplification; 3. Result of *JcAGL9* amplification;
4. Result of *JcAGL11* amplification; 5. Result of *JcAGL15* amplification; 6. Result of *JcAGL61-3* amplification; 7. Result of
JcAGL62-1 amplification; 8. Result of *JcAGL62-6* amplification; 9. Result of *JcAGL62-7* amplification;
10. Result of *JcAGL80-2* amplification; 11. Result of *EF* amplification.

图 2 普通 PCR 扩增结果

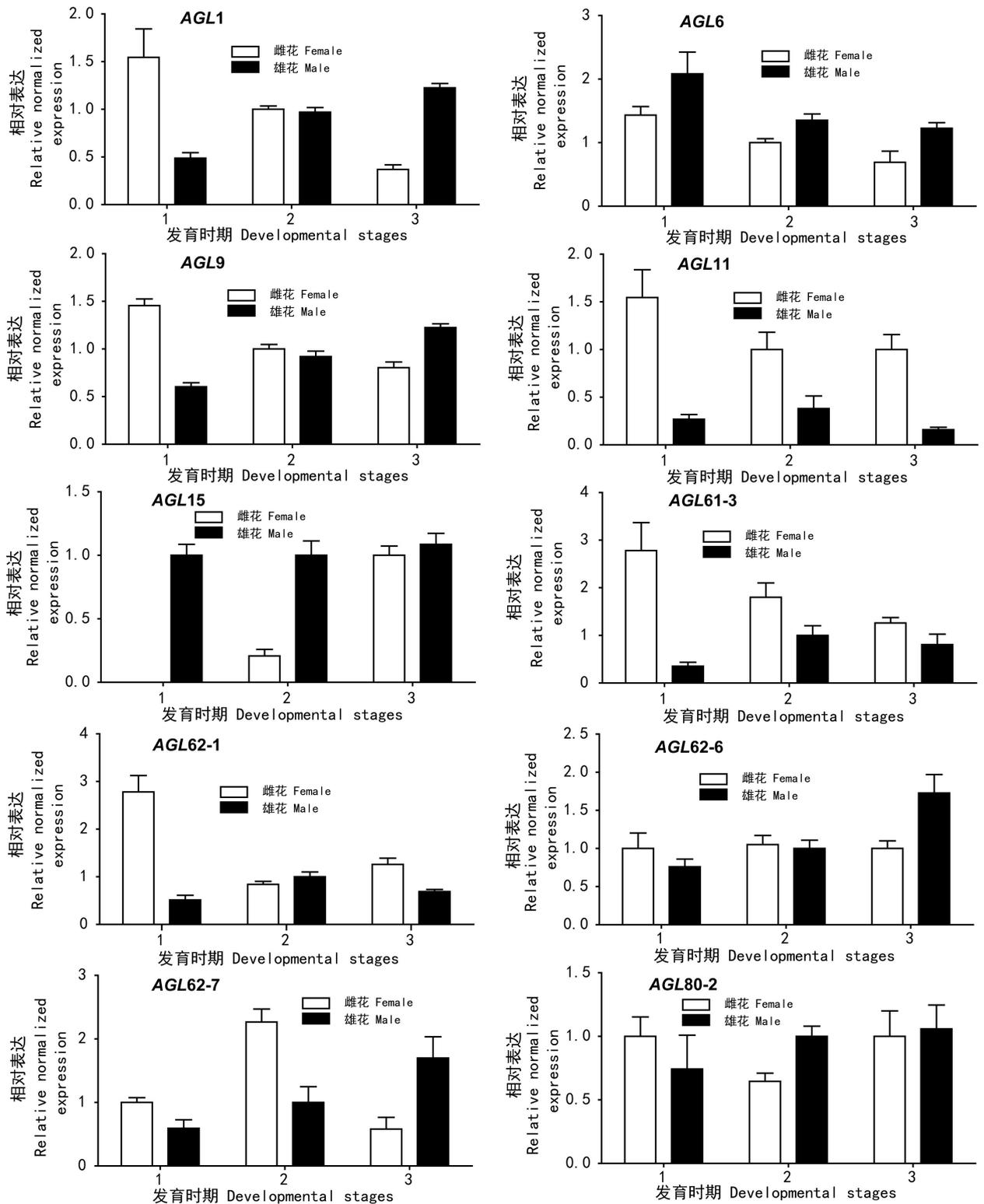
Fig.2 Results of normal PCR reactions

趋势,但整体上雄花中的表达量要高于雌花。*JcAGL11* 在雌雄花中的表达情况明显不同,虽然雌花发育的第二、第三阶段相对于第一阶段有所下降,但三个阶段均处于比较高的表达水平;雄花中虽然第二阶段相对于其他两个阶段的表达量有所上升,但整体上都处于较低表达的状态。*JcAGL15* 基因在雄花发育的三个阶段一直有比较高的表达,且表达量基本稳定;在雌花发育中,一阶段未表达或表达量过低,到二阶段才有明显的表达,直至第三阶段达到较高的水平。*JcAGL61-3* 在雌花中的表达如同 *JcAGL1* 和 *JcAGL9*,初期表达量很高,远高于 *JcAGL1* 和 *JcAGL9* 在雌花发育第一阶段的表达量,之后随时间表达量逐渐降低,但依旧有较高的表达水平;在雄花中,第一阶段的表达量相较于雌花低,到第二阶段有所上升但仍低于雌花,到第三阶段又下降。*JcAGL62-1* 在雌花中的表达随发育先下降后上升,第一阶段表达量很高,第三阶段相较第二阶段虽有所上升但不及第一阶段水平;在雄花中表达量则是先上升后下降。*JcAGL62-6* 在雌花中的表达量基本保持稳定的,而在雄花中表达量则是逐渐上升。*JcAGL62-7* 在雄花中表达

量逐渐上升;在雌花中,表达量随时间先上升后降低,在第二阶段的表达量最高。*JcAGL80-2* 在雌花中表达量先下降后上升,第三阶段和第一阶段表达水平相似;在雄花中表达量逐渐上升,但第二阶段到第三阶段上升幅度不大(如图 3)。

3 讨论与结论

根据 Wu et al(2011)对麻疯树早期花发育的描述,通过体式显微镜对麻疯树雌雄花进行形态结构观察,将采集到的处于发育早期的麻疯树雌雄花按发育时期分成第一、第二、第三阶段。第一阶段为花发育的起始,开始由营养生长向生殖生长转变,花原基出现并开始发育。大量研究表明,雌雄分化是花原基选择性发育的结果(Delong et al, 1993; Grant et al, 1994),在分子水平上就是表现为相关基因的选择性表达,因此麻疯树花早期发育的第一阶段特定基因的差异表达是决定麻疯树花性别的重要因素。从表达结果可以看出,在第一阶段各个目的基因在雌雄花中的表达情况均有一定的差异,其中 *JcAGL1*, *JcAGL9*, *JcAGL11*, *JcAGL15*, *JcAGL61-3*,



注：横坐标的 1、2、3 分别表示早期花发育的第一阶段、第二阶段、第三阶段。实验 3 孔重复，柱的高度表示基因的相对表达量的高低，标准误差在图上标出。

Note: 1, 2, and 3 of the abscissa in this figure represent the first, second and third stages of early flower development, respectively. Each experiment was repeated three times, the height of the column indicates the level of relative expression of the gene and standard errors of analysis are indicated by the vertical bars.

图 3 qPCR 检测结果

Fig. 3 Results of real-time quantitative PCR reactions

JcAGL62-1 差异最为明显,表明目的基因的差异表达可能会影响雌、雄花原基的分化。

在发育初期决定花原基性别后,各个目的基因表达水平的变化又直接或间接影响雌雄花的进一步生长发育。*JcAGL1* 和 *JcAGL9* 在雌雄花中的表达模式相反,在雌花中随着发育表达量逐渐降低,说明对雌花发育有负调控作用;在雄花中则是逐渐升高,说明还能正向调控雄花发育。*JcAGL11* 在花发育三个阶段雌花中的表达量均明显高于雄花,这表明该基因在雌花的早期发育过程中发挥重要作用。*JcAGL15* 在第一、第二阶段雄花中表达量要明显高于雌花,该基因在发育初期的高表达有效促进花原基向雄花分化;第三阶段该基因在雌花中表达量明显上升,雌雄花中表达水平接近,说明 *JcAGL15* 也可以促进雌雄蕊的进一步成熟,在拟南芥中 *AtAGL15* 主要参与胚胎发生和果实成熟(Heck et al, 1995; Fernandez et al, 2000; Harding et al, 2003), *JcAGL15* 在第三阶段的表达情况可能是在为胚胎的发生做准备,这与拟南芥中功能相似。*JcAGL61-3* 和 *JcAGL62-1* 在第一阶段发育中雌花的表达量要明显高于雄花,高表达可以诱导花原基向雌花发育;之后 *JcAGL61-3* 在雌花中的表达量逐渐降低,呈现出负调控作用;而 *JcAGL62-1* 在雌花中表达量迅速下降至与雄花相当的表达水平,可能是因为该基因主要是在发育起始这一特定时期发挥功能,行使功能后便迅速恢复至正常水平。*JcAGL62-6* 在雄花中表达量逐渐升高,说明有促进雄蕊发育的作用;在雌花中没有明显变化,说明不参与雌蕊的发育;而且无论是在雌花还是雄花中表达量都比较高,说明可能还有参与到花非性别器官的生长和发育。*JcAGL62-7* 和 *JcAGL80-2* 在雄花中表达量逐渐升高,表现出正调控作用;在雌花的第二个发育阶段 *JcAGL62-7* 表达相对于其他两个阶段上调,而 *JcAGL80-2* 则是下调,说明这两个基因在雌花第二阶段的发育中发挥较大的作用,前者为正调控,后者为负调控。*JcAGL6* 在雌雄花中表达差异不大,表达量随着发育逐渐降低,说明可能主要参与到花的发育,对性别分化的影响较小。

本研究利用 qRT-PCR 对麻疯树中的 10 个

MADS-BOX 基因的表达进行了检测和分析,结果表明目的基因参与麻疯树的雌雄分化以及花发育,而且各个基因表达情况不同,说明它们各自发挥不同的功能,但所发挥的具体功能以及相关机理尚不是很清楚,因此还需要进一步对目的基因的功能进行探究。

参考文献:

- BAHADUR B, SUJATHA M, CARELS N, 2013. *Jatropha*, challenges for a new energy crop, vol. 2: genetic improvement and biotechnology [M]. Springer New York: 263-299.
- BEMER M, WOLTERS-ARTS M, GROSSNIKLAUS U, et al, 2008. The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules [J]. *Plant Cell*, 20(8):2088-2101.
- CHIKARA J, JAWORSKY G, 2007. The little shrub that could—maybe [J]. *Nature*, 449: 652-655.
- COLOMBO M, MASIERO S, VANZULLI S, et al, 2008. *AGL23*, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 54(6): 1037-1048.
- DE BODT S, RAES J, FLORQUIN K, et al, 2003. Genome-wide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants [J]. *J Mol Evol*, 56(5): 573-586.
- DELONG A, CALDERON-URREA A, DELLAPORTA SL, 1993. Sex determination gene TASSELSEED 2 of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion [J]. *Cell*, 74(4): 757-768.
- FERNANDEZ DE, HECK GR, PERRY SE, et al, 2000. The embryo MADS domain factor *AGL15* acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression [J]. *Plant Cell*, 12(2):183-198.
- GRANT S, HUNKIRCHEN B, SAEDLER H, 1994. Developmental differences between male and female flowers in the dioecious plant *Silene latifolia* [J]. *Plant J*, 6(4): 471-480.
- GUO CG, WANG CW, LI JF, 2007. Observation on phenology and flower development of *Jatropha curcas* [J]. *Mod Agric Sci Technol*, (1): 12-13. [郭承刚, 王朝文, 李建富, 2007. 麻疯树物候期和花的发育动态观察 [J]. *现代农业科技*, (1): 12-13.]
- HARDING EW, TANG W, NICHOLS KW, et al, 2003. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15 [J]. *Plant Physiol*, 133(2): 653-663.
- HE YP, FEI SM, XU J, 2008. The inflorescence structure and dynamics of male and female flowers of *Jatropha curcas* in Sichuan Province [J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 29(2): 1-

8. [何亚平, 费世民, 徐嘉, 2008. 四川麻疯树花序结构和雌雄花动态研究 [J]. 四川林业科技, 29(2):1-8.]
- HECK GR, PERRY SE, NICHOLS KW, et al, 1995. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos [J]. *Plant Cell*, 7(8):1271-1282.
- HENSCHER K, KOFUJI R, HASEBE M, et al, 2002. Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *Mol Biol Evol*, 19(6):801-814.
- HUANG F, CHI YJ, YU DY, 2012. Research advances of MADS-box genes in plants [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 5(5):9-18. [黄方, 迟英俊, 喻德跃, 2012. 植物 MADS-box 基因研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 5(5):9-18.]
- HUANG K, LOUIS JM, DONALDSON L, et al, 2000. Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors [J]. *Embo J*, 19(11):2615-2628.
- Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 1979. Key to family and genera of Chinese higher plant [M]. Beijing: Science Press: 253. [中国科学院植物研究所, 1979. 中国高等植物科属检索表 [M]. 北京: 科学出版社: 253.]
- KANG IH, STEFFEN JG, PORTEREIKO MF, et al, 2008. The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 20(3):635-647.
- KARUPPAIYA P, YAN XX, LIAO W, et al, 2017. Identification and validation of superior reference gene for gene expression normalization via RT-qPCR in staminate and pistillate flowers of *Jatropha curcas*-A biodiesel plant [J]. *Pone*, 12(2):e0172460.
- KAUFMANN K, MELZER R, THEISSEN G, 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Gene*, 347(2):183-198.
- KOFUJI R, SUMIKAWA N, YAMASAKI M, et al, 2003. Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses [J]. *Mol Biol Evol*, 20(12):1963-1977.
- KÖHLER C, HENNIG L, SPILLANE C, et al, 2003. The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1 [J]. *Genes Dev*, 17(12):1540-1553.
- KÖHLER C, PAGE DR, GAGLIARDINI V, et al, 2005. The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb group protein controls expression of PHERES1 by parental imprinting [J]. *Nat Genet*, 37(1):28-30.
- LIN J, YAN F, TANG L, et al, 2003. Anti-tumor effects of curcumin from seeds of *Jatropha curcas* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 24(3):241-246.
- NEGUSSIE A, ACHTEN WM, VERBOVEN HA, et al, 2014. Floral display and effects of natural and artificial pollination on fruiting and seed yield of the tropical biofuel crop *Jatropha curcas* [J]. *Glob Chang Biol Bioen*, 6(3):210-218.
- PARENICOVÁ L, DE FOLTER S, KIEFFER M, et al, 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world [J]. *Plant Cell*, 15(7):1538-1551.
- PELLEGRINI L, TAN S, RICHMOND TJ, 1995. Structure of serum response factor core bound to DNA [J]. *Nature*, 376(6540):490-498.
- PORTEREIKO MF, LLOYD A, STEFFEN JG, et al, 2006. AGL80 is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 18(8):1862-1872.
- SMACZNIAK C, IMMINK RG, ANGENENT GC, et al, 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies [J]. *Development*, 139(17):3081-3098.
- STEFFEN JG, KANG IH, PORTEREIKO MF, et al, 2008. AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 148(1):259-268.
- WEI JF, WEI DP, WU XK, 2013. Research progress on seed characteristics and its affecting factors of *Jatropha curcas* [J]. *Seed*, 32(2):51-55. [韦剑锋, 韦冬萍, 吴炫柯, 2013. 麻疯树种子特性及其影响因素研究进展 [J]. 种子, 32(2):51-55.]
- WEI Q, LIAO Y, ZHOU LJ, et al, 2004. Antifungal activity of curcumin from seeds of *Jatropha curcas* [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 26(3):71-75.
- WOLLMANN H, MICA E, TODESCO M, et al, 2010. On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development [J]. *Development*, 137(21):3633-3642.
- WU J, LIU Y, TANG L, et al, 2011. A study on structural features in early flower development of *Jatropha curcas* L. and the classification of its inflorescences [J]. *Afr J Agric Res*, 6(2):275-284.
- YOO SK, LEE JS, AHN JH, 2006. Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 348(3):929-936.