

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2020.40536

李逸, 王璇, 刘志雄. 甜荞 *FaesSTK* 基因在长花柱长雄蕊突变体 *lpls* 中的表达分析[J]. 植物科学学报, 2020, 38(4): 536-542Li Y, Wang X, Liu ZX. Expression analysis of *FaesSTK* gene in *Fagopyrum esculentum* Moench with long pistil and stamen[J]. *Plant Science Journal*, 2020, 38(4): 536-542

## 甜荞 *FaesSTK* 基因在长花柱长雄蕊突变体 *lpls* 中的表达分析

李逸, 王璇, 刘志雄\*

(长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025)

**摘要:** 采用 RACE 技术, 从甜荞 (*Fagopyrum esculentum* Moench) 中克隆获得 3 种花型的 *STK* 同源基因 *FaesSTK*, 并对其序列特征进行分析。结果显示, 甜荞 3 种花型植株 *STK* 同源基因序列一致, 全长为 967 bp, 包含长 689 bp 的完整开放阅读框, 编码一个由 225 个氨基酸残基组成的 D 类 MADS-box 转录因子。蛋白序列比对及系统发育分析结果表明, *FaesSTK* 蛋白属于 MADS-box 转录因子中的 *STK* 进化系。包含 1 个由 57 个氨基酸残基组成的高度保守的 MADS 结构域; 1 个由 82 个氨基酸残基组成的次级保守区域的 K 结构域, 在 C 端的转录激活区还含有另外 2 个高度保守的基序 (AG I 和 AG II)。实时荧光定量检测结果显示, *FaesSTK* 基因主要在甜荞 *lpls* 突变体的雄蕊、雌蕊和不同发育时期的幼果中表达, 在根和花被片中仅能检测到微弱的转录信号, 在叶和茎中不表达, 其中在雌蕊和果实中的表达量极显著高于其他组织。推测该基因在花发育过程中可能主要参与调控甜荞 *lpls* 突变体雌蕊和果实的发育。

**关键词:** 甜荞; 花发育; *FaesSTK* 基因

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)04-0536-07

## Expression analysis of *FaesSTK* gene in *Fagopyrum esculentum* Moench with long pistil and stamen

Li Yi, Wang Xuan, Liu Zhi-Xiong\*

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

**Abstract:** Using RACE technology, three flower types of *STK* homologous gene *FaesSTK* (GenBank accession number: MN597104) were examined from *Fagopyrum esculentum* Moench, and their sequence characteristics were analyzed. Sequence alignment results suggested that the sequences of the gene from the three flower types were identical. The gene was 967 bp in length and contained a 689 bp open reading frame (ORF) encoding 225 amino acids. Protein sequence alignment and phylogenetic analyses grouped the *FaesSTK* protein into the *STK* lineage of D-class MADS-box transcription factors. *FaesSTK* contained a highly conservation MADS domain with 57 amino acids, a secondary conserved K-domain with 82 amino acids, as well as two highly conserved motifs (AG I motif and AG II motif) in the variable C-terminal region. In addition, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) revealed that the *FaesSTK* gene was mainly expressed in the stamen, gynoecium, and young fruits at different developmental stages in the *F. esculentum lpls* mutant. Moreover,

收稿日期: 2019-12-17, 退修日期: 2020-01-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771867, 31571736)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31771867, 31571736)。

作者简介: 李逸(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为园林植物与应用(E-mail: 759102933@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zylu77@yahoo.com)

*FaesSTK* was weakly transcribed in the root and tepal but was absent in the leaf and stem. *FaesSTK* expression levels in the gynoecium and fruit were significantly higher than that in other tissues. Our data suggest that *FaesSTK* may play a major role in the development of the gynoecium and fruit of the *F. esculentum lpls* mutant.

**Key words:** *Fagopyrum esculentum*; Flower development; *FaesSTK*

甜荞 (*Fagopyrum esculentum* Moench) 为蓼科荞麦属 (*Fagopyrum*) 一年生草本作物, 生育周期短、抗逆性强、极耐寒脊<sup>[1]</sup>。甜荞的籽粒不仅含有丰富的蛋白质、纤维素及等营养成分, 还具有抗氧化、降血压、降低毛细血管脆性等方面的药理功效, 具有极高的营养价值和保健功能<sup>[2, 3]</sup>。

作为典型的二型花柱作物, 甜荞自然群体中短花柱长雄蕊 (thrum 型) 和长花柱短雄蕊 (pin 型) 植株按 1:1 分离<sup>[4, 5]</sup>, 仅异型花间 (pin 型与 thrum 型) 授粉才能正常结实, 同型花间授粉不结实<sup>[6]</sup>。普通甜荞通过异花授粉进行繁殖, 但是由于自交不亲和, 在自然条件下的结实率低, 产量不稳定, 严重制约甜荞育种的发展及产业化开发和利用<sup>[7, 8]</sup>。因此, 探索甜荞花和果实发育相关基因的功能及其调控机制, 不仅有利于甜荞的分子育种及种质创新, 同时对甜荞的杂交育种和产量的提高有重要的应用价值。

本实验室前期在甜荞品种‘北早生’群体中发现了长花柱长雄蕊 *lpls* (long pistil and long stamen, *lpls*) 自然突变单株, 通过隔离传粉和单粒传获得了雌雄蕊等长、亲和性好、遗传性状稳定, 同型花和异型花间均能正常授粉结实的株系, 是开展甜荞杂交育种工作良好的材料。前人在研究模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 的花与角果的发育规律及调控机制时发现, *SEED-*

*STICK* (*STK*) 基因主要参与控制植物胚珠和种子的正常发育, 促进成熟种子散播的 D 类 MADS-box 基因, 在角果的成熟和开裂中起到重要作用<sup>[9]</sup>。番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 的 *TAGL11* 基因和黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 的 *CUM10* 基因, 都是 *STK-like* 基因, 两者都在雄蕊和心皮中表达<sup>[10]</sup>。在基部真双子叶植物三叶木通 (*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.) 中, 其 *STK* 同源基因 *Ak-TAG2* 在发育着的雄蕊和心皮中均有表达, 说明其在表达模式和功能上具有多样性<sup>[11]</sup>。因此, 为了弄清甜荞 *STK* 同源基因的结构, 及其在花和果实发育调控中所产生的作用, 本研究通过同源克隆的方法分离甜荞 *STK* 同源基因 *FaesSTK*, 分析该基因的序列结构, 并检测其在甜荞雌雄蕊等长 *lpls* 突变体植株中表达的组织特异性, 阐明该基因在甜荞花发育过程中的表达模式和功能, 以期在 *STK* 同源基因在蓼科植物花发育调控中的作用和生物学功能研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以甜荞品种‘北早生’群体中筛选获得的自然变异长花柱长雄蕊 *lpls* 株系为材料 (图 1), 挑选甜荞 3 种花型颗粒饱满的瘦果, 于 2019 年 8 月底, 播种于盛满营养基质的花盆中 (21 cm × 14 cm ×



A: Thrum 型花 (短花柱长雄蕊); B: Pin 型花 (长花柱短雄蕊); C: *lpls* 突变体花 (长花柱长雄蕊)。  
A: Thrum flower with short pistil and long stamen; B: Pin flower with long pistil and short stamen; C: *lpls* flower with long pistil and long stamen.

20 cm), 待 9 月底到 10 月份盛花期时将花盆搬至实验室。用消毒灭菌的镊子, 分别从不同植株上采集根、茎、叶, 同时剥离其花被片、雄蕊、雌蕊及发育 2、4、6、8、10 d 的幼果, 置于 2 mL 的 EP 管中, 经液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存、备用。

1.2 实验方法

1.2.1 甜芥 STK 同源基因克隆

采用 RNA 提取试剂盒分别提取甜芥突变体 *lpls* 不同组织的总 RNA, 并反转录为 cDNA。

根据甜芥花芽第三代全长转录组测序结果 (BioProject ID: PRJNA517031), 拼接甜芥 STK 同源基因序列 F01.PB3034, 在 5' 非翻译区 (5'-UTR) 设计基因特异性扩增引物 GSPFaesSTK, 分别以甜芥 3 种花型的花芽总 RNA 为模板, 采用 3'-Full Race Core Set Ver.2.0 试剂盒 (TaKaRa) 反转录合成甜芥花芽的 3'RACE 第一链 cDNA, 获得甜芥 *FaesSTK* 同源基因的全长序列。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min; 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经检测后送测序, 获得甜芥 *FaesSTK* 同源基因的全长序列。实验所用引物见表 1。

表 1 引物名称及序列  
Table 1 Primer name and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'–3')
GSPFaesSTK	CTTGACAGGTGATTAGCTGAG
QFaesSTKF	CGAGTACATACAGAAGAAGGAG
QFaesSTKR	ACATACCAAGCTGAAGAGGC
QFeactinF	ACCTTGCTGGACGTGACCTTAC
QFeactinR	CCATCAGGAAGCTCATAGTTC

1.2.2 蛋白同源序列比对及分子系统发育分析

将甜芥 *FaesSTK* 同源基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行 BlastP 同源比对搜索, 选取 20 种来自不同植物的 STK 同源蛋白 (表 2), 采用 MEGA 5.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建蛋白序列的分子系统发育树, 同时选取 *STK* (拟南芥, OAO98566.1)、*PpSTK* (水蜜桃 *Prunus persica* (L.) Batsch, ABQ85556.1)、*FPB11* (矮牵牛 *Petunia × hybrida* Vilm., CAA57445.1)、

*TAGL11* (番茄, AAM33102.2) 等 7 个物种的 8 个同源蛋白, 采用 Bioedit 7.0 软件中的 Clustal W 程序, 对 3 种花型的甜芥 *FaesSTK* 转录因子的结构域进行分析。

1.2.3 甜芥 *FaesSTK* 基因的在雌雄蕊等长 *lpls* 突变体中的表达分析

分别提取甜芥雌雄蕊等长 *lpls* 突变体株系的根、茎、叶、花被片、雄蕊、雌蕊及发育 2、4、6、8、10 d 的幼果总 RNA, 反转录成 cDNA。在 *FaesSTK* 基因的 3' 端设计上、下游引物 QFeactinF 和 QFeactinR (表 1), 以荞麦 *Faesactin* (HQ398855.1) 基因为内参, 进行实时荧光定量 PCR 实验, 检测甜芥 *FaesSTK* 基因在雌雄蕊等长突变体 *lpls* 不同组织中表达的特异性。扩增体系及 PCR 程序参照说明书进行, 基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算<sup>[12]</sup>。

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 采用最小显著性差异法 (Least significant difference, LSD) 对甜芥 *FaesSTK* 基因的表达水平进行显著性差异分析, 并用 Excel 2013 软件作图。

2 结果与分析

2.1 甜芥 STK 同源基因全长 cDNA 的序列特征

本研究从甜芥 3 种花型的花序中分离到 *STK* 同源基因的 cDNA 全长。通过基因序列比对分析, 发现 3 种花型的甜芥序列一致。序列结构分析结果显示: 甜芥 *STK* 同源基因 cDNA 全长为 967 bp, 包括 22 bp 的 5'UTR (untranslated region)、689 bp 的完整 ORF 和 256 bp 的 3'UTR; 编码 225 个氨基酸残基和 1 个终止密码子。分析结果表明该基因为 MADS-box 基因家族中的 STK 进化系, 命名为 *FaesSTK* (登录号: MN597104)。

2.2 蛋白质序列比对与分子系统发生关系

蛋白质同源蛋白分析结果表明 (图 2), *FaesSTK* 转录因子在 N 端具有 1 个高度保守的包含 57 个氨基酸 (1 ~ 57) 的 MADS 结构域; 1 个包含 82 个氨基酸 (91 ~ 173) 的次级保守区域 K, 其中又分为 3 个保守区域 K1 (91 ~ 113)、K2 (126 ~ 140) 和 K3 (147 ~ 172)。同时这 3 个区域中含有许多疏水氨基酸位点; 位于 M 区和 K 区之间, 还有 1 个保守性较低的 I 区, 包含 32 个氨基酸 (58 ~ 90)。在 C 末端的转录激活区, 具有 2 个高度保守

表 2 用于序列比对和系统发育分析的物种信息  
Table 2 Information on sequences selected for alignment and phylogenetic analyses

种名 Species	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession No.	系 Lineage
松下兰 <i>Monotropa hypopitys</i> L.	MhSTK	AQM52292.1	D
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	STK	OAO98566.1	D
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i> L.	BoAG	AGT96410.1	C
水蜜桃 <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	PpSTK	ABQ85556.1	D
樱桃 <i>Prunus avium</i> (L.) Moench	PaSTK	AEH41428.1	D
	PaMADS5	AFM30905.1	C
苹果 <i>Malus domestica</i> Mill.	MdMADS10	CAA04324.1	D
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	VvAGL11	AAM21345.1	D
	VvAG	NP_001268097.1	C
矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i> Vilm.	FBP11	CAA57445.1	D
	FBP7	CAA57311.1	D
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	SITAGL11	AAM33102.2	D
连香 <i>Cercidiphyllum japonicum</i> Sieb. et Zucc.	CjAGL11	ASY97762.1	D
球花石斛 <i>Dendrobium thyrsiflorum</i> Rchb. f.	DtSTK	AAY86365.1	D
	DtAG	AAY86364.1	C
蕙兰 <i>Cymbidium faberi</i> Rolfe.	CfSTK	QDF44725.1	D
	CfAG1	AFP19447.1	C
意大利红门兰 <i>Orchis italica</i> Poir.	OiMADS1	AFU81325.1	D
	OiMADS	AFU81324.1	C
百子莲 <i>Agapanthus praecox</i> Hoffmgg.	ApAG2	BAC66963.1	D
天门冬 <i>Asparagus virgatus</i> (Lour.) Merr.	AvMADS1	BAD83772.1	D
洋葱 <i>Allium cepa</i> L.	AcMADS	AGV31153.1	C
芝麻 <i>Sesamum indicum</i> L.	SiAG	AIS82595.1	C
黄金树 <i>Catalpa speciosa</i> (Barney) Engelm.	CsAG	AJZ73175.1	C
诗琳通木兰 <i>Magnolia sirindhorniae</i> Noot. & Chalermglin.	MsAG	AGZ63865.1	C
星花木兰 <i>Magnolia stellata</i> Thunb.	MsAG	ALF02827.1	C
芍药 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	PIAG	AQM56558.1	C
萍蓬草 <i>Nuphar advena</i> (Hoffm.) DC.	NaAG	ADD25196.1	C
咖啡 <i>Coffea arabica</i> L.	CaAG	AHW58037.1	C
山茶 <i>Camellia japonica</i> L.	CjAG	ADU15476.1	C
猕猴桃 <i>Actinidia arguta</i> Planch.	AaAG	ADU15476.1	C

的基序 AG I motif(201~213)和 AG II motif(228 ~ 244)<sup>[11-13]</sup>。

分子系统进化分析结果显示(图 3), *FaesSTK* 蛋白与 15 个被子植物共 16 个 STK 同源蛋白共聚于 STK 进化系, 与松下兰(*Monotropa hypopitys* L.)、矮牵牛、番茄的 STK 同源蛋白共聚于双子叶植物的小进化分枝, 说明亲缘关系较近。同时该蛋白与拟南芥 *STK/AGL11* 的氨基酸序列相似度高达 64.2%, 而与兰科、百合科等单子叶植物分隔较远, 说明亲缘关系较远。

因此, 甜芥 *FaesSTK* 属于 D 类 MADS-box 基因, 其在 M、K 和 C 区结构域的保守性说明该转录因子在调控花和果实发育方面的功能具有一定保

守性, 但其在 I 区及转录激活区的氨基酸序列存在较大差异, 可能使其功能呈现一定的分化。

2.3 甜芥 *FaesSTK* 基因在雌雄蕊等长 *lpls* 突变体中的表达分析

实时荧光定量分析结果显示(图 4), *FaesSTK* 基因主要在甜芥 *lpls* 突变体的雄蕊、雌蕊和不同发育时期的幼果中表达, 在根和花被片中仅能检测到微弱的转录信号, 而在叶和茎中不表达。进一步检测 *FaesSTK* 基因在甜芥 *lpls* 突变体雄蕊、雌蕊和 5 种(2、4、6、8、10 d)不同发育时期的幼果中表达量的差异时发现, 其在雌蕊中的相对表达量极显著高于雄蕊(*LSD*, *P* < 0.01); 此外, *FaesSTK* 在 5 种不同发育时期的幼果中的表达量均高于雌蕊,



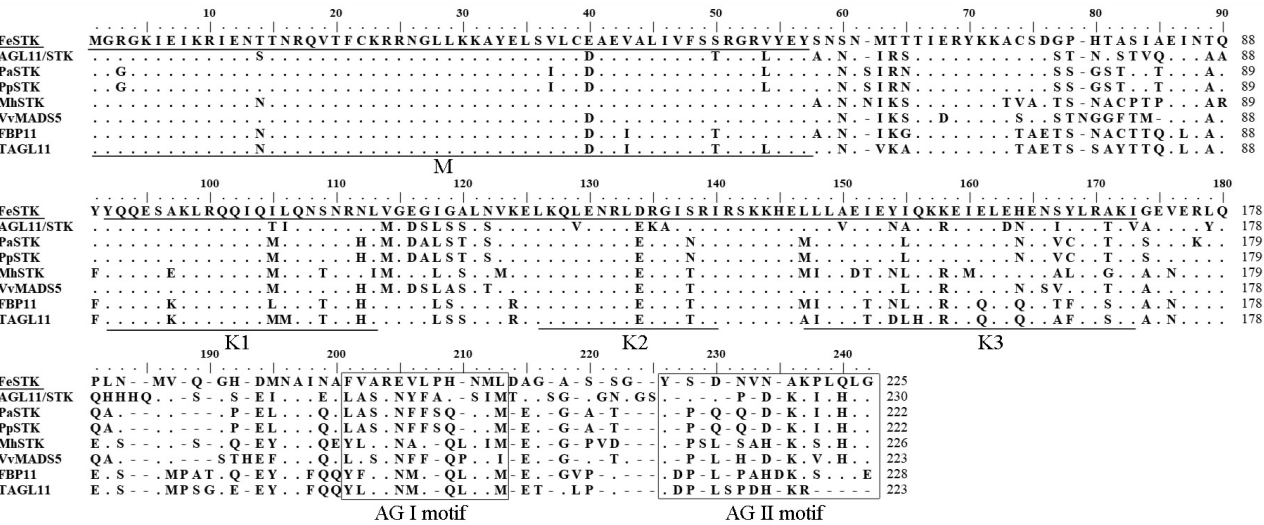
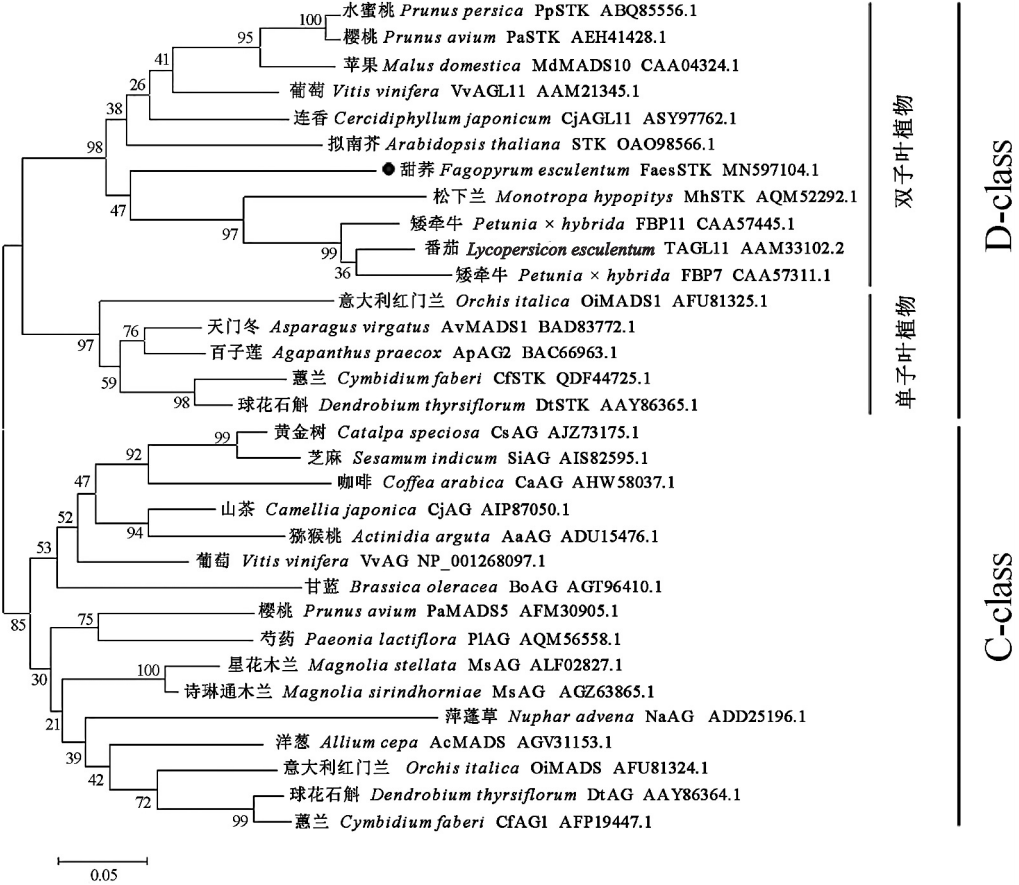


图 2 FaesSTK 蛋白序列比对与结构分析

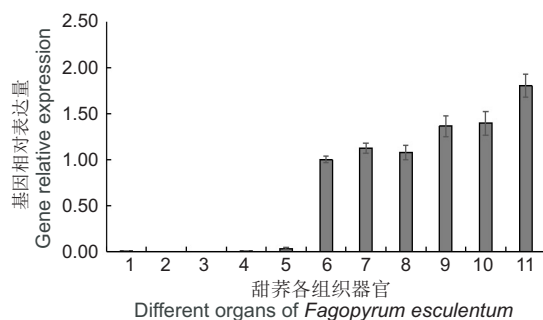
Fig. 2 Alignment of putative amino acid sequences of FaesSTK with other homologous protein sequences



分支上的数字表示 1000 次重复计算获得的自展百分比。  
Number represents bootstrap percentage values calculated by 1000 replicates.

图 3 FaesSTK 蛋白与其他植物 C-class 和 D-class 同源蛋白分子系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of FaesSTK with other C-class and D-class proteins



1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4: 花被片; 5: 雄蕊; 6: 雌蕊; 7 ~ 11: 不同发育时期的幼果(2、4、6、8、10 d)。  
1. Root; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Tepal; 5: Stamen; 6: Gynoecium; 7-11: Young fruits at different developmental stages (2, 4, 6, 8, 10 d).

图4 *FaesSTK* 基因在甜芥 *lpls* 突变体不同组织器官中的表达量

Fig. 4 Expression of *FaesSTK* in different organs of *F. esculentum* *lpls* mutant

且在发育 10 d 的幼果中相对表达量差异达到极显著水平 ( $LSD, P < 0.01$ )。随着果实发育和成熟, *FaesSTK* 的表达量逐渐升高。在果实的发育前期(2、4、6、8 d), *FaesSTK* 在幼果中的表达量无显著差异, 随着果实的继续发育和成熟, 该基因在发育 10 d 的幼果中的表达量极显著升高 ( $LSD, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

在模式植物拟南芥中, *STK* 基因作为 MAD-box 家族的 D 类基因, 主要是参与控制胚珠和种子正常发育, 促进成熟种子散播<sup>[14, 15]</sup>。拟南芥的近缘种油菜 (*Brassica napus* L.) 的 *STK* 同源基因在种子发育和油脂积累过程中强烈表达, 说明该基因可能在种子发育及油脂的合成中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。在蔷薇类 (Rosids) 植物水蜜桃中, 其 *STK* 同源基因 *PpSTK* 主要在子房、果皮和内果皮中表达, 仅在花被片和花药中检测到微弱信号<sup>[17]</sup>。*FBP7* 和 *FBP11* 是菊类 (Asterids) 植物矮牵牛的 *STK-like* 基因, 二者最初在花芽原基的中心部位表达, 随着心皮和胚珠的发育, 其转录活性限制在胚珠和内珠被中, 参与调控胚珠和子房的发育<sup>[18]</sup>。在菊类植物番茄中, *STK* 同源基因 *TAGL11* 主要在花和果实发育晚的胚珠和种皮上表达, 参与胚珠和种子的发育<sup>[19]</sup>。向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 的 *STK* 同源基因 *HaAGL11*, 其主要在子房和发育未成熟的果实中特异性表达, 在雄蕊中微量表

达<sup>[20]</sup>。上述研究结果表明, 核心双子叶植物 *STK-like* 基因的表达模式和功能呈现出多样性, 在不同类群的被子植物中, 由于 *STK-like* 基因序列结构的差异导致其表达模式和功能呈现一定的分化, 但主要参与胚珠和果实的发育。在本研究中, 通过对 *FaesSTK* 基因在甜芥 *lpls* 突变体中的组织特异性和表达量的动态变化分析, 发现 *FaesSTK* 主要在雌蕊、雌蕊和不同发育时期的幼果中表达, 且其在雌蕊和果实中的表达量显著高于其他器官, 与其他真双子叶植物 *STK* 同源基因的表达模式类似, 推测 *FaesSTK* 在甜芥 *lpls* 突变体花发育过程中主要参与雌蕊和果实的发育。

在单子叶植物中, 蕙兰 (*Cymbidium faberi* Rolfe) 的 *STK-like* 同源基因 *CfSTK* 主要调控子房和合蕊柱的发育<sup>[21]</sup>。*OiSTK* 是意大利红门兰 (*Orchis italica* Poir.) 的 *STK* 同源基因, 该基因主要在根、合蕊柱和雌蕊中表达, 在唇瓣中仅检测到微弱的转录信号<sup>[22]</sup>。在球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum* Rchb. f.) 中, *DthyrAG1* (C 类基因) 和 *DthyrAG2* (D 类基因) 均在成熟花和胚珠发育过程中转录, 原位杂交分析结果表明, 这两个基因都在花柱、柱头和花柱管中转录<sup>[23]</sup>。在百合科植物水仙 (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.) 中, 其 *STK* 同源基因 *NtSTK* 在水仙品种‘金盏银台’和‘玉玲珑’的雌蕊和子房中表达量最高, 仅在根和叶上检测到微弱的转录信号<sup>[24]</sup>。在甜芥中, *FaesSTK* 在雌蕊和果实中的表达量最高, 说明 *STK* 同源基因在不同被子植物中的组织表达特异性有一定差异。该基因在甜芥花和果实中的具体功能, 有待进一步研究和考证。

### 参考文献:

- [1] Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Impact of polyphenols on extracellular vesicle levels and effects and their properties as tools for drug delivery for nutrition and health[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 644(1): 57-63.
- [2] 刘瑞, 于章龙, 柴永峰, 孙元琳, 宋昱, 等. 粮谷及其发芽物质变化研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 293-298.  
Liu R, Yu ZL, Chai YF, Sun YL, Song Y, et al. Research advances of substances variation in grain and germinated grain[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 293-298.
- [3] 张柯彬, 陈炳全, 刘志雄. 甜芥 *FaesAP2* 基因的克隆与表达分析[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(3): 354-361.

- Zhang KB, Chen BQ, Liu ZX. Cloning and expression analysis of the *FaesAP2* gene from *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35 (3): 354–361.
- [4] Takeshima R, Nishio T, Komatsu S, Kurauchi N, Matsui K. Identification of a gene encoding polygalacturonase expressed specifically in short styles in distylous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Heredity*, 2019, 123(4): 492–502.
- [5] Li LY, Fang ZW, Li XF. Isolation and characterization of the C-class MADS-box gene from the distylous pseudo-cereal *Fagopyrum esculentum* [J]. *J Plant Biol*, 2017, 60 (2): 189–198.
- [6] 方正武, 刘志雄. 甜荞花同源异型基因 *FeMADS1* 的克隆和序列结构分析[J]. 西北农业学报, 2015, 24(3): 82–87.  
Fang ZW, Liu ZX. Cloning and sequence analysis of *FeMADS1* gene from *Fagopyrum esculentum* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2015, 24(3): 82–87.
- [7] 陈稳良, 李秀莲, 史兴海, 梁改梅, 刘龙龙, 等. 甜荞等花柱资源与栽培甜荞杂交初步研究[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(4): 1030–1035.  
Cheng WL, Li XL, Shi XH, Liang GM, Liu LL, et al. A preliminary study on the hybridization of common buckwheat isostyle resources and cultivated buckwheat [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(4): 1030–1035.
- [8] 黄凯丰, 李振宙, 王炎, 周良, 吴兴慧, 等. 我国荞麦高产栽培生理研究进展[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(1): 115–120.  
Huang KF, Li ZZ, Wang Y, Zhou L, Wu XH, et al. Research progress on physiology of buckwheat under high-yield cultivation [J]. *Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences)*, 2019, 37(1): 115–120.
- [9] Dreni L, Kater MM. MADS reloaded: evolution of the AG-AMOUS subfamily genes [J]. *New Phytol*, 2014, 201(3): 717–732.
- [10] 刘磊. 番茄果实果肉性状的精细定位与候选基因分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [11] 山红艳. 三叶木通花发育相关基因的结构、功能和进化研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2006.
- [12] Hu MZ, Hu WB, Xia ZQ, Zhou XC, Wang WQ. Validation of reference genes for relative quantitative gene expression studies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by using quantitative real-time PCR [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(7): 680.
- [13] Yang YZ, Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(1): 45–59.
- [14] Callens C, Tucker MR, Zhang D, Wilson ZA. Dissecting the role of MADS-box genes in monocot floral development and diversity [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(10): 2435–2459.
- [15] Herrera-Ubaldo H, Lozano-Sotomayor P, Ezquer I, Di MM, Chávez MRA, et al. New roles of *NO TRANSMITTING TRACT* and *SEEDSTICK* during medial domain development in *Arabidopsis* fruits [J]. *Development*, 2019, 146(1): 172395.
- [16] 熊书, 李彦杰, 周大祥. 油菜 MADS-box 家族基因 *AGL11* 的克隆、表达及转化油菜的研究 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2174–2178.  
Xiong S, Li YJ, Zhou DY. Cloning and expression and transformation of MADS-box family gene *AGL11* in *Brassica napus* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(10): 2174–2178.
- [17] Tani E, Polidoros AN, Fletmetakis E, Stedel C, Kalloniati C, et al. Characterization and expression analysis of AG-AMOUS-like, SEEDSTICK-like, and SEPALLATA-like MADS-box genes in peach (*Prunus persica*) fruit [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(8): 690–700.
- [18] Colombo L, Franken J, vander Krol AR, et al. Downregulation of ovule specific MADS box genes from petunia results in maternally controlled defects in seed development [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(5): 703–715.
- [19] Busi MV, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio SB, et al. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(4): 801–815.
- [20] 何卓远, 韦小英, 苏周, 吴雨, 雷豆, 等. 向日葵 MADS-box 家族基因 *HaAGL11* 的克隆及表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 21(1): 260–268.  
He ZY, Wei XY, Su Z, Wu Y, Lei D, et al. Cloning and expression analysis of the MADS-box family gene *HaAGL11* in sunflower [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 21(1): 260–268.
- [21] 费越, 夏胜应, 熊海燕, 刘志雄. 蕙兰 *CyfaSTK* 基因的克隆与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(5): 602–609.  
Fei Y, Xia SY, Xiong HY, Liu ZX. Cloning and expression analysis of *CyfaSTK* gene from *Cymbidium faberi* [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(5): 602–609.
- [22] Salemm M, Sica M, Gaudio L, Aceto S. The *Oita AG* and *Oita STK* genes of the orchid *Orchis italica*: a comparative analysis with other C- and D-class MADS-box genes [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3523–3535.
- [23] Skipper M, Johansen LB, Pedersen KB, Frederiksen S, Johansen BB. Cloning and transcription analysis of an AG-AMOUS and SEEDSTICK ortholog in the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb f.) [J]. *Gene*, 2006, 366(2): 266–274.
- [24] 吴菁华, 吴少华, 杨超, 张志忠, 林文雄. 中国水仙 *NtSTK* 基因的克隆、序列和组织表达分析 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(10): 1820–1824.  
Wu JH, Wu SH, Yang C, Zhang ZZ, Lin WX. cDNA Cloning, sequence analysis and tissue expression of *NtSTK* in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(10): 1820–1824.