

何金花,杨正修,姜路华,等. 荠菜 *TPD1* 基因启动子与 *GUS* 基因表达载体的构建及拟南芥遗传转化[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):25-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.006

荠菜 *TPD1* 基因启动子与 *GUS* 基因表达载体的构建及拟南芥遗传转化

何金花,杨正修,姜路华,方磊,赵燕

(湖南农业大学生物科学技术学院,湖南长沙 410128)

摘要: *TAPETUM DETERMINANT1* (*TPD1*) 基因编码 1 个含 176 个氨基酸的配体蛋白,依赖于 *EMS1* 基因编码的富亮氨酸(LRR-RLK)蛋白受体激酶参与花粉形成的调控并可在心皮进行异位表达,参与心皮形态建成。为探讨 *TPD1* 基因在荠菜心皮形态建成中的表达模式,采用同源克隆法从荠菜中克隆 *CbTPD1* 基因启动子构建 *GUS* 融合表达载体 *CbTPD1pro::GUS*,通过根癌农杆菌介导的浸花序法转化 *Columbia* 生态型拟南芥。对 T_1 代幼苗、花序、心皮等组织部位进行 *GUS* 染色观察。结果表明,荠菜 *CbTPD1* 基因在幼苗、花丝、柱头、蜜腺、早期果荚等部位均有表达,但在花药中未见表达,与 *AtTPD1* 在花药中的表达模式存在差异。该结果为研究 *AtTPD1*、*CbTPD1* 基因在拟南芥、荠菜心皮形态建成中的作用提供了有价值的依据。

关键词: 拟南芥;荠菜;*CbTPD1* 启动子;遗传转化;*GUS* 组织化学染色

中图分类号: Q785;S636.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0025-05

植物花器官发育是植物生长周期的重要过程,也是发育生物学研究引人注目的事件。从最早提出的花器官发育 ABC 模型,逐步扩展到 ABCD 模型、ABCDE 模型。目前,关于花器官的发生和发育相关的基因调控网络已经积累了大量的

收稿日期:2018-08-31

基金项目:湖南农业大学大学生科创课题(编号:XCX16016)。

作者简介:何金花(1995—),女,重庆人,研究方向为植物基因及分子生物学。E-mail:hejinhua0625@163.com。

通信作者:赵燕,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事细胞生物学及植物基因工程研究。E-mail:zhaoyan0585@163.com。

的不同浓度和与其他激素的组合可以使外植体向产生愈伤和产生不定芽 2 种生长途径定向发展,生成愈伤途径有助于植株及品种的扩繁,生成不定芽途径有助于快速生产和一步成苗等技术的研究,这为该植物在后期的研究和生产扩繁中提供了参考,且选用直接诱导出芽途径,所产生的不定芽外形美观,植株饱满,成活率高,更大程度上继承了母本的一些形态特征,耗时较短。

在生根诱导过程中,发现活性炭的添加对根系的生长尤为重要。已发表的玉扇组培体系研究^[1-3]中,得出最佳生根培养基为 MS+0.1 mg/L NAA 浓度,并未见活性炭成分的添加,且本试验将 NAA 浓度、IBA、蔗糖和活性炭进行了组合筛选,得到了较为高效的生根诱导培养方案。

玉扇作为百合科十二卷属的精品代表植物,市场价格一直居高不下,对于玉扇组培体系的研究虽有过报道,但在激素的选择和配比上却不尽完善,商品化生产的组培苗品质参差不齐。本试验通过总结该属其他植物及玉扇已报道过的激素配比与外植体选择,将激素浓度、配比选取不同的外植体进行全面的筛选与研究,最终得出较好的激素组合方案,所培育的组培苗植株饱满,耗时较短,成活率高。调节 6-BA 浓度从

信息,发现并克隆了一系列有关控制花器官分化和发育的基因。如控制拟南芥中花瓣、雄蕊、心皮、胚珠发育所必需的 *STK*、*SHP*、*SEP*、*API*、*AP3*、*AG*、*PI*、*LFY* 等基因^[1-5]。其中与雌蕊发育相关的基因包括 *AGAMOUS* (*AG*)、*CRABSCLAW* (*CRC*)、*SEUSS* (*SEU*)、*SPATULA* (*SPT*)、*STYLISH1* (*STY1*) 等^[6]。拟南芥心皮发育主要受 *CRC*、*SPT*、*AG* 基因的控制,这 3 个基因相互关联并发生作用^[7],三者属于 *MADS-box*^[8-9] 中的成员。Yang 等在研究花粉不育的过程中克隆了拟南芥 *TAPETUM DETERMINANT* (*TPD1*) 基因,*TPD1* 编码 1 个含 176 个氨基酸的小蛋白与 *EMS1* 基因编码的 1 个 LRR-RLK

而对不同的生长途径进行调控,有利于从不同方向对种苗进行产业化推广,这对玉扇的规模化生产具有指导意义,也为该植物的组培快繁及科学研究提供了参考。

参考文献:

- [1] 许继勇,麦瑜玲,郑添群,等. “高地”截形瓦苇的组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 天津农业科学,2006,12(2):8-10.
- [2] 李 劼,张 静,卢 涛. 玉扇的快速繁殖[J]. 中国科技信息,2008(12):78.
- [3] 孙 涛,李德森. 截形十二卷的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):586.
- [4] 熊丙全,田 进,廖相建,等. 多肉植物玉扇组培快繁体系的建立[J]. 北方园艺,2018(7):72-77.
- [5] 何佳越,余丽萍,黄雪丽,等. 帝玉露的离体培养及快速繁殖技术研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(8):148-150,160.
- [6] 陈 龙,景丹龙,王军辉. 6 个不同种源梓树叶片的总酚含量和抗氧化性能的比较[J]. 西北林学院学报,2015,30(6):222-226.
- [7] 王 燕,牟豪杰,吕永平,等. 寿锦的离体植株再生及组培产业化增殖[J]. 植物学报,2017,52(3):331-336.

(富亮氨酸)蛋白受体激酶^[10-11]共同作用,参与花粉形成的调控机制^[12],*TPD1* 主要是在小孢子母细胞中表达,其突变体 *tpd1* 在花药细胞层出现发育缺陷,突变体的绒毡层细胞被额外形成的小孢子母细胞所取代。Yang 等通过进一步研究,构建了 35S::*TPD1* 过表达载体在拟南芥的心皮中进行异位表达,结果显示,拟南芥长果角的心皮形态变宽变短了^[13]。Huang 等证实了 *AtTPD1* 基因在胚珠中的表达^[14],*AtTPD1* 的异位表达可引起胚珠和种子发育中的多效缺陷,如改变胚珠发育期间生长素信号基因和核心细胞周期基因的表达,使细胞周期蛋白基因 *CYCD3* 和 *CYCA2* 在胚珠中的表达水平增高,一旦 *CYCD3* 表达模式受到影响,细胞周期则会发生紊乱,致使心皮细胞横向分裂能力增强最终导致心皮变宽^[15]。

拟南芥和荠菜同为十字花科植物,二者在遗传背景、生理特性上有着较多的相似性,但其心皮形态差异显著,拟南芥为二心皮发育成的柱形长角果,而荠菜则为二心皮心型短角果,说明两者的同源基因在表达部位和表达模式上存在差异。为探讨荠菜 *CbTPD1* 基因在心皮形态建成中的作用,本研究构建 *TPD1* 基因启动子的 *GUS* 融合表达载体,转化拟南芥,以期探讨 *TPD1* 基因在拟南芥和荠菜雌蕊(心皮)形态建成过程中表达模式的差异提供重要的生物学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Columbia 生态型,荠菜 (*Capsella bursa-pastori*) 为野生型,均采集于湖南农业大学耘园实习基地;根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefactions*) GV3101、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、载体 pCambia1301 均由湖南农业大学生物科学技术学院细胞生物学研究室提供。

1.2 植物培养条件

用 0.1% 氯化汞对拟南芥种子进行表面消毒 8 min,于超净工作台上用无菌水漂洗 8~10 次,以适当密度播种于含 10% 蔗糖的 1/2MS 固体培养基上,避光,在 4℃ 条件下春化 3 d,转入光照培养室(光周期昼/夜为 16 h/8 h,22℃ 恒温,50% 恒湿)培养。待其长至 14 d 时,转入盛有浸透营养液的人工土壤(腐殖土、蛭石、珍珠岩体积比为 3:1:1)中,盖上透明塑料薄膜培养 2 d,生长条件同上。

1.3 pCA1301 - *CbTPD1pro*::*GUSWTBZ* 表达载体的构建及遗传转化

1.3.1 *CbTPD1* 基因启动子片段的克隆 根据 GenBank 公布的红花荠菜 *TPD1* 基因序列推导出上游启动子区域序列,利用 DNAUSERchs 软件,分析 *CbTPD1pro* 启动子序列的酶切位点。采用 DNAMAN 设计扩增引物 *CbTPD1pro* - UP 和 *CbTPD1pro* - DN,在引物的 5' 端分别引入 *Sma* I 和 *Nco* I 酶切位点,*CbTPD1pro* - UP:TCCCCGGGCTCGTGTGATTCTGATTACTCTCT;*CbTPD1pro* - DN:CATGCCATGGGTGCTTAGACGTCGGGAACT,以荠菜总 DNA 为模板进行 PCR(预变性 95℃,7 min;变性 94℃,40 s;退火 68℃,40 s;延伸 72℃,100 s;终末延伸 72℃,7 min;共 30 个循环)扩增,琼脂糖凝胶电泳后回收纯化目的片段。

1.3.2 pCA1301 - *CbTPD1pro*::*GUS* 载体构建及工程农杆菌

的制备 用 *Sma* I 和 *Nco* I 限制性内切酶在 37℃ 条件下过夜双酶切 pCambia1301 载体和目的片段,将得到的目的片段和目的载体进行回收。用 *T₄* 连接酶将 *CbTPD1* 基因启动子连接至 pCambia1301 载体的预期位点。通过热激法将重组载体转化至大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定并送华大基因测序以证实重组质粒的正确性,并将测序得到的荠菜 *CbTPD1* 基因启动子序列与拟南芥 *AtTPD1* 基因启动子进行元件的对比分析。

挑选测序正确的重组质粒通过电击法转化根瘤农杆菌 GV3101,将转化液置于 YEB 固体培养基(内含 50 mg/mL 利福平 + 50 mg/mL 庆大霉素 + 50 mg/mL 卡那霉素)上,28℃ 黑暗过夜培养,挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定并进行扩大培养,用于植物的转化。

1.4 拟南芥的遗传转化及转基因植株的鉴定

采用浸花序法转化 Columbia 生态型拟南芥。收获 *T₀* 代种子播种于含潮霉素(30 mg/L)的 1/2MS 固体培养基上,在植物生长室培养 2 周左右将抗性植株移栽至人工土壤中正常生长,为检测目的片段是否已经整合到转化受体的基因组中,当植株长至 6~8 叶时,以 CTAB 法提取抗性植株叶片的 DNA 为模板,设计 *GUS* 基因特异性引物 PC - *TPD1pro*UP - CTCGTGTGATTCTGATTACTCTCTPC - *GUS*DN - CGAAACGCAGCACGATACGC 对转基因植株进行 PCR 检测,以 Columbia 生态型拟南芥为对照,鉴定转基因植株。

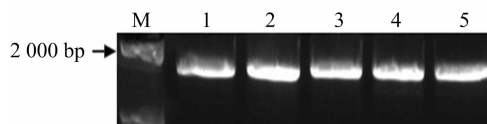
1.5 转基因植株的 *GUS* 组织化学染色及显微观察

取拟南芥转基因植株的幼苗及花序等置于 *GUS* 染液中进行抽真空,直至材料组织沉入染液底部。置于 37℃ 恒温箱避光染色 12 h 左右,脱色后将染色组织置于奥林巴斯 SZX10 体式显微镜下观察染色结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 *CbTPD1* 启动子的克隆

根据 GenBank 公布的红花荠菜 *TPD1* 基因序列推导出上游启动子区域序列,设计扩增引物,以荠菜总 DNA 为 PCR 模板进行同源克隆,扩增出与预期大小 1 561 bp 相符的目的片段(图 1),经测序比对与预期一致,说明成功克隆了荠菜 *CbTPD1pro* 的启动子序列。

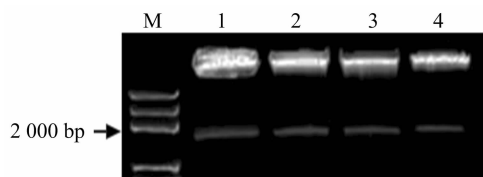
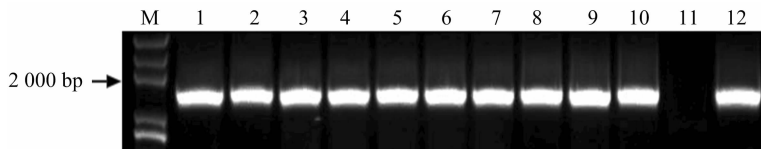
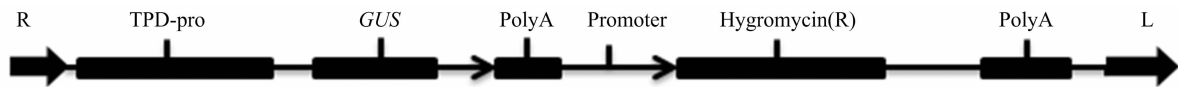


M 表示 DL 5000 marker; 1、2、3、4、5 表示克隆的荠菜 *CbTPD1pro*, 是 PCR 扩增后荠菜基因启动子的凝胶电泳结果

图1 荠菜 *CbTPD1pro* 基因的克隆

2.2 pCA1301 - *CbTPD1pro*::*GUS* 载体的构建

对克隆至 T 载体上的 *CbTPD1pro* 片段的重组质粒 pMD18 - *CbTPD1pro* 和植物表达 Ti 质粒载体 pCambia1301 用 *Sma* I 和 *Nco* I 分别进行双酶切,纯化酶切产物,进行连接反应,构建 pCA1301 - *CbTPD1pro*::*GUS* 融合表达载体(图 2)。将连接产物热激转化到大肠杆菌,然后从大肠杆菌中 DH5 α 提取该重组载体,再转化到农杆菌感受态 GV3101 中,GV3101 菌落 PCR 检测(图 3)和酶切鉴定(图 4),与预期的



CbTPD1pro 1 600 bp 左右大小相符,说明 pCA1301 - *CbTPD1pro::GUS* 报告载体构建成功。

2.3 *CbTPD1* 基因启动子测序与启动子元件分析

通过 PlantCARE 启动子在线分析软件,对荠菜 *CbTPD1* (图 5)、拟南芥 *AtTPD1* 基因启动子元件的比较分析(表 1)发现,二者均具有植物启动子最基本的高转录水平调控因子、光响应元件、茉莉酸酯、赤霉素响应等元件。但二者的逆境胁迫

响应元件存在较大差异,如 *CbTPD1pro* 缺乏水杨酸响应顺式作用元件,赤霉素与茉莉酸酯响应元件也与 *AtTPD1pro* 有差异,*CbTPD1pro* 元件中包含了参与玉米素代谢途径,以及在胚乳表达的顺式作用元件,而 *AtTPD1pro* 元件中却没有。其主要差异体现在胚乳表达元件、光响应元件以及对赤霉素、水杨酸的响应等方面。

2.4 拟南芥遗传转化及筛选

将成功转入农杆菌的重组载体,通过浸花法转化 *Columbia* 生态型拟南芥。收获 T₀ 代种子平铺于筛选培养基 (1/2 MS + 3% 蔗糖 + 7% 琼脂 + 30 mg/mL 潮霉素) 上, 7 d 左右种子均可萌发。在植物生长室培养 2 周后可观察到, 非转基因的拟南芥幼苗中由于没有潮霉素抗性基因的表达, 其根与真叶的分化受到抑制, 叶片卷曲、植株无根, 而后慢慢黄化萎蔫; 成功转入重组载体的拟南芥幼苗则正常生根, 分化真叶, 可以长出莲座叶 (图 6 中黑色箭头所示)。



2.5 转基因植株的鉴定

将抗性苗移栽至营养钵,待生长健壮后取单株叶片提取DNA作模板,用检测引物 *PC-TPD1proUP/PC-GUSDn* 进行PCR分子检测。由图7可知,1号泳道为野生型阴性对照,2号泳道为质粒阳性对照,3~12号泳道为转基因阳性植株的分子检测,其中除4号、8号、12号泳道检测未获得目的条带,其余均可扩增出预期大小为1561 bp的目的条带,即为转基因植株。PCR扩增结果表明,外源目的基因已整合进植株基因组中。

2.6 转基因植株的 *GUS* 组织化学染色及显微观察

将转基因拟南芥 T₁ 代种子平铺于筛选培养基 (1/2

MS + 3% 蔗糖 + 7% 琼脂 + 30 ng/mL 潮霉素) 上, 置于光照培养室生长 7 d 后对幼苗进行 *GUS* 染色检测, 14 d 左右移栽至营养钵继续生长, 对其花序进行 *GUS* 染色检测, 通过实体显微镜观察。其染色结果(图 8、图 9)显示, 转基因拟南芥幼苗中, 芥菜 *CbTPD1pro::GUS* 在幼苗期子叶、真叶、根、根毛等部位均可见明显的 *GUS* 着色, 表明芥菜 *CbTPD1* 启动子驱动的 *GUS* 报告基因在拟南芥幼苗各部位均有高水平的表达(图 8-A、图 8-B 为转 *35S::GUS* 阳性对照)。花序中花器的果荚柄、花丝、蜜腺、柱头及花瓣的维管束等部位均检测到明显的 *GUS* 活性(图 8-E、图 8-F、图 8-G、图 8-H), 但在花药中却没有 *GUS* 活性的表达(图 8-F), 这与实验室前期

表 1 荠菜与拟南芥 *TPD1* 启动子元件分析比对

元件名称	元件功能	荠菜	拟南芥
5UTRPy – richstretch	高转录水平调控因子	√	√
ABRE	ABA 响应元件	×	√
ARE	厌氧反应响应	×	√
Box I	光响应元件	√	√
Box 4	光响应元件	√	×
CAAT – box		√	√
CATT – motif	光响应元件	√	×
I – box	光响应元件	×	√
TATA – box		√	√
TCA – element	水杨酸响应	×	√
TC – rich repeats	胁迫响应元件	×	√
TCT – motif	光响应元件	×	√
ERE	乙烯响应元件	√	√
CGTCA – motif	茉莉酸酯响应	√	×
GARE – motif	赤霉素响应	×	√
TATCCAT/C – motif		√	×
G – box	光响应	√	√
G – Box	光响应	×	√
GA – motif	光响应	√	×
O2 – site	参与玉米素代谢	√	×
CATT – motif	光响应元件	√	×
L – box	光响应	√	×
Sp1	光响应	√	×
GAG – motif	光响应	√	×
GCN4 – motif	在胚乳表达元件	×	√
ATCT – motif	光响应模块	×	√
TGACG – motif	茉莉酸酯响应	√	√
MBS		×	√
GATT – motif	光响应元件	×	√
TATC – box	赤霉素响应	√	√

注:红色部分表示两者具有差异,√代表具有该元件,×代表无该元件。

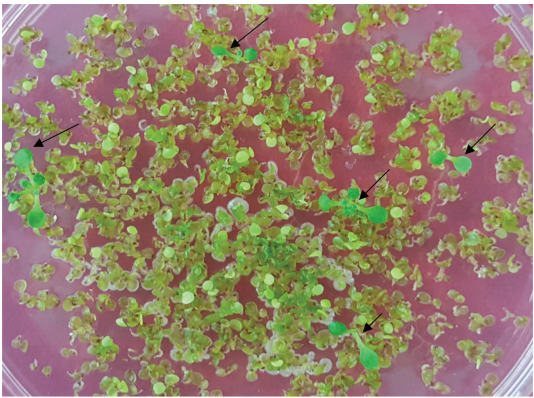
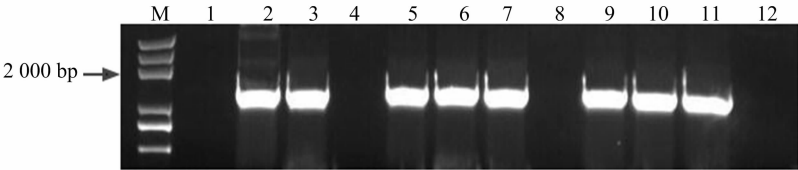


图6 潮霉素筛选转基因植株

AtTPD1 在拟南芥花药中的过表达结果不同,拟南芥 *AtTPD1* 在花药中表达明显(图 9 – A、图 9 – B)。从花器发育的几个时期取材进行 *GUS* 染色的结果分析发现,*CbTPD1pro::GUS* 在花序幼嫩的花蕾期几乎不表达(图 8 – C、图 8 – E)。当花器发育至第 8 至第 9 期左右时,*CbTPD1* 基因可在雌蕊的柱头表达,随后开始在花托、花萼、蜜腺等部位表达,其中在第 12、第 13 期左右其表达量达到峰值,在后续心皮发育过程中,心皮的顶部及基部始终具有较高水平的表达(图 8 – C、图 8 – E、图 8 – F、图 8 – G,图 8 – D 为野生型花序对照)。其 *GUS* 基因在荠菜花器官中的表达活性和组织定位,为后续研究 *CbTDP1* 基因在荠菜、拟南芥心皮发育过程中的不同表达模式提供了有价值的依据。

3 讨论

本研究以 pCAMBIA1301 为出发质粒构建了荠菜 *CbTPD1* 基因启动子的 *GUS* 融合表达载体,并通过转化 *Columbia* 生态型拟南芥获得了稳定遗传的转基因植株,为进



M—Mark; 1—野生型阴性对照; 2—质粒阳性对照; 4、8、12—为非转基因植株; 其余泳道均为抗性植株

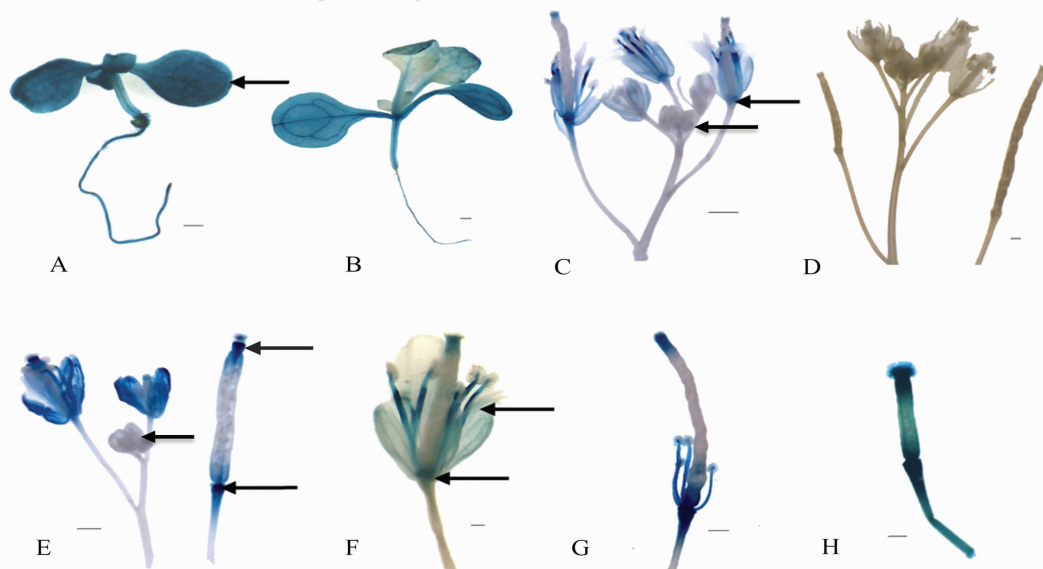
图7 *CbTPD1pro::GUS* 转基因植株的电泳检测结果

一步研究 *CbTPD1* 基因的表达特征提供了可靠的材料。现有研究表明,*AtTPD1* 在绒毡层发育时期主要是在生殖细胞中表达,它的突变影响绒毡层细胞的分化发育,使花药细胞层出现发育缺陷,其绒毡层细胞被额外形成的小孢子母细胞所取代^[16],*TPD1* 可通过与 *EMS1* 互作参与花粉形成的调控并可在心皮进行异位表达,参与心皮形态建成。有意思的是,本研究将荠菜 *CbTPD1* 启动子驱动的 *GUS* 基因转化拟南芥后发现,荠菜 *CbTPD1* 却不在拟南芥的花药(雄蕊)中表达,这与 Yang 等报道的拟南芥 *AtTPD1* 参与绒毡层的形成及小孢子母细胞的发育等研究结果^[13] 不同,这暗示了 *CbTDP1* 基因可能不参与绒毡层和小孢子母细胞的发育,而是特异性地在心皮中表达并影响和促进其最终发育成短角果,或在参与花粉发育调控网络的位置上与拟南芥有所差异,*TDPI* 基因在荠菜、

拟南芥心皮发育过程中的不同表达模式,影响整个心皮发育的基因调控网络而导致了两者心皮形态的差异。但植物心皮形态发育过程受多种基因调控,这些基因协同参与心皮形态的建成,除主效基因直接参与调控心皮发育外,生长素的极性运输和浓度分布都对雌蕊顶端发育及心皮的形态建成具有重要作用。本研究通过对荠菜 *CbTPD1* 启动子在拟南芥中的 *GUS* 染色定位分析为深入研究该基因对心皮形态建成的影响奠定了研究基础。

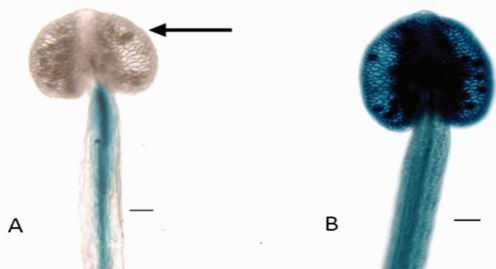
参考文献:

[1] Pinyopich A, Ditta G S, Savidge B, et al. Assessing the redundancy of MADS – box genes during carpel and ovule development[J]. Nature, 2003, 424(6944): 85 – 88.



A 为幼苗的 *GUS* 染色, 箭头所示为叶片, 比例尺为 1 mm; B 为转 35S::GUS 的幼苗染色, 比例尺为 0.1 mm; C 为花序 *GUS* 染色, 箭头所示分别为花托和花蕾, 比例尺为 2 mm; D 为野生型花序及心皮对照, 比例尺为 0.1 mm; E 为花序及心皮的 *GUS* 染色, 箭头所指分别为蜜腺、花蕾、柱头, 比例尺为 2 mm; F 为成熟花器的 *GUS* 染色, 箭头所指分别为花丝和花托, 比例尺为 0.5 mm; G 为心皮 *GUS* 染色, 比例尺为 0.2 mm; H 为转化株早期心皮的 *GUS* 染色, 比例尺为 1 mm

图8 荠菜 *CbTPD1pro* 启动子在拟南芥花器官的 *GUS* 表达染色观察



A 为 *CbTPD1pro*::GUS 转化株花药的 *GUS* 染色, 箭头所指为花药, 比例尺为 0.02 mm; B 为 *AtTPD1pro*::GUS 转化株花药的 *GUS* 染色, 比例尺为 0.02 mm

图9 荠菜 *CbTPD1pro* 与拟南芥 *AtTPD1pro* 启动子在花药的 *GUS* 表达染色结果

- [2] Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, et al. MADS - box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15 (11): 2603 - 2611.
- [3] Liljgren S J, Ditta G S, Eshed Y, et al. SHATTERPROOF MADS - box genes control seed dispersal in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2000, 404: 766 - 770.
- [4] Coen E S. Flower development [J]. Current Opinion in Cell Biology, 1992, 4 (6): 929 - 933.
- [5] Weigel D. The genetics of flower development: from induction to ovule morphogenesis [J]. Annual Review of Genetics, 1995, 29: 19 - 39.
- [6] Schwarz - sommer Z, Huijser P, Nacken W, et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus* [J]. Science, 1990, 250 (4893): 931 - 956.
- [7] 赵 燕, 黄丽华, 蒋 向, 等. 荠菜 CRABS CLAW 的克隆与拟南芥遗传转化 [J]. 西北植物学报, 2009, 29 (11): 2162 - 2167.

- [8] Yuan Y X, Wu J, Sun R F, et al. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* *FLC1* gene is associated with variation in flowering time [J]. Exp Bot, 2009, 60 (4): 1299 - 1308.
- [9] De B S, Raes J, Vand P Y, et al. And then there were many *MADS* goes genomic [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8 (10): 475 - 483.
- [10] Yang S L, Xie L F, Mao H Z, et al. *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther [J]. The Plant Cell, 2003, 15 (12): 2792 - 2804.
- [11] Jia G X, Liu X D, Owen H A, et al. Signaling of cell fate determination by the *TPD1* small protein and EMS1 receptor kinase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105 (6): 2220 - 2225.
- [12] Liu Z, Franks R G, Klink V P. Regulation of gynoecium marginal tissue formation by *LEUNIG* and *AINEGUMENTA* [J]. Plant Cell, 2000, 12 (10): 1879 - 1892.
- [13] Yang S L, Jiang L X, Puah C S, et al. Overexpression of *TAPETUM DETERMINANT1* alters the cell fates in the *Arabidopsis* carpel and tapetum via genetic interaction with excess microsporocytes1/extra sporogenous cells [J]. Plant Physiology, 2005, 139 (1): 186 - 191.
- [14] Huang J, Wijeratne A J, Tang C, et al. Ectopic expression of *TAPETUM DETERMINANT1* affects ovule development in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67 (5): 1311 - 1326.
- [15] 王慧博, 赵剑春, 黄守程, 等. 拟南芥 *CYCD3;1* 基因的克隆及功能研究 [J]. 西北植物学报, 2007, 27 (11): 2153 - 2157.
- [16] 杨克珍, 叶 德. 植物雄配子体发生和发育的遗传调控 [J]. 植物学通报, 2007, 24 (3): 293 - 301.