

番茄花柄离区发育基因 *JOINTLESS* 及互作蛋白基因的功能研究

王翔^{1,2}, 尹钧^{1,*}

(¹河南农业大学国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 番茄离区发育控制基因 *JOINTLESS* (*J*) 是一个 MADS-box 家族基因。MADS-box 基因是植物花发育过程中一类重要的转录因子, MADS-box 蛋白调节高等植物发育过程中往往形成复合体控制基因的转录。为了研究 *J* 及其互作蛋白在番茄发育过程中的重要作用, 选择 7 个与 *JOINTLESS* 蛋白互作的 MADS-box 基因进行 RNAi 功能研究。研究结果表明 *TAG1* 基因不仅严重影响番茄雄蕊和雌蕊的形态, 还影响果实的育性。同时对 *J* 进行了过量表达分析, 研究结果表明, *J* 过量表达不但显著增加了番茄花序的分支和花的数量, 还改变了果实形状。

关键词: 番茄; *JOINTLESS*; MADS-box 基因; RNAi; 过量表达

中图分类号: S 641.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 04-0701-08

Functional Studies of *JOINTLESS* and Its Interacting MADS-domain Proteins in Tomato

WANG Xiang^{1,2} and YIN Jun^{1,*}

(¹National Center for Wheat Research, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

Abstract: The MADS-box gene *JOINTLESS* (*J*) is required for flower abscission zone formation in tomato. MADS-box genes encode a class of transcription factors that usually form protein complexes controlling the transcription of genes. This study aims to identify the specific function of *J* and its interacting MADS-box in tomato. Seven of the *JOINTLESS*-interacting MADS-domain proteins are selected, and the functions of their encoding genes are studied using RNA interference (RNAi) and transgenic overexpression strategies. It is found that knockdown of *TAG1* expression not only causes severe morphological changes in male and female floral organs but also reduces fertility. Overexpression of *J* leads to higher than normal numbers of flowers in individual inflorescences and changes in fruit shape.

Key words: tomato; *JOINTLESS*; MADS-box gene; RNAi; overexpression

番茄花柄离区发育基因 *JOINTLESS* (以下用 *J* 表示) 的突变会引起番茄果(花)柄离区的消失。Mao 等(2000)发现该基因的突变是由于第 1 个外显子的部分序列连同起始密码子的上游共 939 bp

收稿日期: 2011-01-18; 修回日期: 2011-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670188, 30671261)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xmzxyj@126.com)

的碱基缺失引起的, 也通过转基因互补试验证实了该基因在花柄离区发育中的功能。

J 是一个 MADS-box 基因。MADS-box 基因是一类被广泛研究的转录因子, 作为 ABC 模型中的主要参与者, 在高等植物花器官发育过程中起着重要的作用。另外, MADS-box 基因也影响营养吸收、叶发育、春化、开花时间、分生组织分化、果实成熟、胚发育等 (Colombo et al., 1995; Vrebalov et al., 2002; Rosin et al., 2003; Yan et al., 2003; Adamczyk et al., 2007; Tapia-Lopez et al., 2008)。

MADS-box 基因的一个显著特点是通过形成复合体来调节高等植物的花器官发育。在四重奏模型 (4 个不同的 MADS-box 蛋白形成四聚体与顺式作用元件调控基因表达) 中, MADS-box 家族成员 SEP (SEPALLATA) 类蛋白是形成四聚体蛋白复合体的桥梁 (Honma & Goto, 2001; Theissen, 2001)。Leseberg 等 (2008) 利用酵母双杂交系统研究了番茄的 MADS-box 蛋白互作网络, 并与拟南芥、金鱼草比较, 表明同源蛋白之间表现出相似的互作模式, 但不同物种之间也存在各自的特异性 (Davies et al., 1996; de Folter et al., 2005)。另外, MADS-box 基因中的 MADS 结构域增强了蛋白之间相互作用的特异性。Leseberg 等 (2008) 从 22 个番茄 MADS-box 蛋白中鉴定出了与 *J* 相互作用的 8 个候选 MADS-box 蛋白, 并且发现 *J* 能够自我互作。但该 8 个 MADS-box 基因的功能及其对番茄花柄离区发育的功能尚未见深入报道。本研究中作者选取与 *J* 相互作用的 7 个候选蛋白, 通过 RNAi 技术对这 7 个基因进行功能研究, 并利用过量表达对 *J* 的功能进一步进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2007—2009 年在中国农业科学院作物科学研究所生物信息学与小麦功能基因组学实验室进行。植物材料: 番茄野生型 LA3021 由中国农业科学院毛龙研究员提供。各种转基因番茄材料种植在中国农业科学院北部农场及中国农业科学院作物科学研究所温室。

试剂: 各种限制性内切酶购自 NEB 公司; *Taq*DNA polymerase、*T₄* 连接酶等购自 TaKaRa 公司; IPTG、X gal、吉兰糖胶 (gelrite)、卡那霉素、庆大霉素、利福平、反式玉米素核苷 (Trans-Zeatin-Riboside)、特美叮 (Timentin)、乙酰丁香酮以及各种激素、MS 培养基等购自 Simga 公司; Trizol、反转录酶等购自 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。

质粒和菌株: pGWC-T 载体由中国农业大学王学臣教授提供 (图 1); 根癌农杆菌菌株 GV3101 和表达载体 pjawoh18-RNAi 由中国农业科学院林辰涛教授提供 (图 2)。

PGWC-T 载体长约 3 kb, 与 Gateway 系统兼容, attL1 和 attL2 是 LR 酶和 BP 酶识别的重组位点。Ahd I 酶切后直接产生 T 末端序列, 与 PCR 产物进行连接反应。其中 *ccdB* 基因编码一个毒性蛋白, 通过其致死作用, 可以高效地筛选发生重组反应的阳性克隆。

利用载体 pJawoh18-RNAi 上的 attR1 和 attR2 重组位点进行 LR 和 BP 反应, 可以同时导入方向相反的两个特异片段。本试验设计 35SF 和 35SR、intronF 和 intronR (图 2) 两对载体引物, 结合基因特异引物验证阳性克隆及其转基因植株。

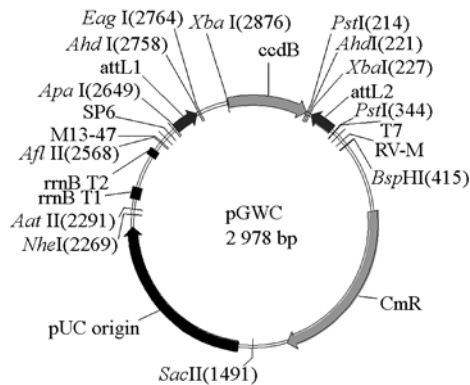


图 1 pGWC-T 载体图

Fig. 1 pGWC-T vector map

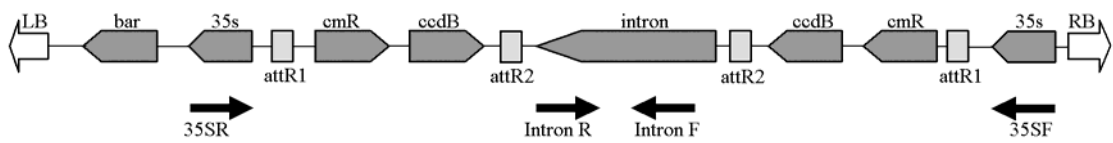


图 2 载体 pJawoh18-RNAi 示意图

Fig. 2 pJawoh18-RNAi vector map

1.2 植物培养基

各种培养基制备参考 Sun 等（2006）的方法。

1.3 载体构建

RNAi 载体构建：依据在 MADS 家族中不同分类和功能，选取与 J 蛋白相互作用的 7 个 MADS-box 基因 *TAG1* (*TOMATO AGAMOUS1*)、*LePI* (*Lycopersicon esculentum PI*)、*TAGL1* (*TAG-Like1*)、*TM3* (*TOMATO MADS3*)、*TM5* (*TOMATO MADS5*)、*SLMBP20* 和 *JIL* (*JOINTLESS LIKE1*)，这 7 个基因各代表 MADS-box 家族不同亚类。利用软件 Primer 5.0 设计每个基因的特异引物，将扩增出的片段克隆到 pGWC-T 中间载体中（表 1），然后通过 LR 反应导入到表达载体 pJawoh18-RNAi 中。

表 1 RNAi 试验中基因的特异片段引物

Table 1 Primers used for amplifying gene-specific fragment in RNAi experiments

基因名称 Gene name	RNAi 引物 Primer of RNAi fragment	片段位置及长度 Position and length of production
<i>TAG1</i>	F: 5' AACAGGAACATGATGGGTGAA 3' R: 5' GGTTGGTCTTGCTAGGGTAA 3'	370 ~ 728
<i>LePI</i>	F: 5' GGAAGTCACTGGTATCCGTGAAA 3' R: 5' GACTCTGAAAGCAAAAGGCATT 3'	370 ~ 615
<i>TAGL1</i>	F: 5' TCGCAATAACTTCCTGCCTGTA 3' R: 5' TGAAGATGAAGAGCCTTGACCC 3'	720 ~ 894
<i>TM3</i>	F: 5' ACCTGAGGTAATAGAGCGAT 3' R: 5' TCTCCCAAGAAGCTTCCTTTT 3'	180 ~ 350
<i>TM5</i>	F: 5' TGTCGCTCAAACAGATCAGAT 3' R: 5' ACATCTTGTGCATTTGGCTG 3'	190 ~ 409
<i>SLMBP20</i>	F: 5' GAATGCTAATGATTCTGATCCC 3' R: 5' TCAGTTGATTCTTCCTGCTTCT 3'	209 ~ 409
<i>JIL</i>	F: 5' CAACCTTCCCCTTGATTACAG 3' R: 5' TCCATTATTCGTTTACCCTTAA 3'	210 ~ 405

J 过量表达载体构建：克隆 *J* 基因全长 cDNA 序列，该序列包含全部编码区和大部分 5' UTR 和 3' UTR。引物设计包含构建到双元载体 pFGC5941 所需的限制性酶切位点 *Xba* I 和 *Sac* I，引物分别为 MAOS-P5 *Sac* I（5'-GAGTGAGCTCCCCTCTTTCTTCATACTCTCTTAG-3'，下划线为 *Sac* I 酶切位点）MAOS-P3 *Xba* I（5'-AGTCTCTAGATACTAACAATAATATTTATATAAAC-3'，下划线为 *Xba* I 酶切位点），然后通过 pEASY-T1 Simple T 载体导入到表达载体 pFGC5941 中。用酶切鉴定正确的质粒转化农杆菌，然后对农杆菌质粒进行 PCR 和酶切双重鉴定，将阳性菌落在 - 80 °C 保存备用。

1.4 农杆菌介导的番茄转化

将 - 80 °C 储存的农杆菌在相应抗生素的 YEB 固体培养基上划线培养 48 h，挑取单克隆。将该克隆在液体 YEB 培养基中震荡培养（28 °C，250 r · min⁻¹）至 OD 值 0.6，取 10 mL 菌液 6 000 r · min⁻¹ 离心 10 min，收集菌体。用液体 MS 培养基重新悬浮，并加入乙酰丁香酮至终浓度为 200 μmol · L⁻¹，用于子叶侵染。

通过子叶转化法转化番茄 LA3021（Sun et al., 2006）。将番茄种子用 75% 酒精浸泡 30 s，然后

用 20%次氯酸钠浸泡 10 min，用灭菌蒸馏水冲洗 3~5 次，播种于 1/2MS 培养基大约 7~8 d 后，在真叶出现之前，将子叶切成 3~4 段，在 M0 培养基上预培养 2 d。农杆菌侵染 10 min 后将子叶片段放回 M0 培养基，黑暗条件下共培养 2 d。然后将子叶片段放在 M1 分化培养基上，每 10 d 继代 1 次，待有再生芽出现时将外植体转移至 M2 培养基，再生芽生长至 2 cm 时将其切下移至 M3 生根培养基，根系健壮后移至包含营养土和蛭石的花盆中。

1.5 转基因植株的鉴定

对于 RNAi 转基因植株的鉴定，采用多重引物组合检测方法。在 RNAi 载体中间的 intron 设计一对上下游引物，结合 35S 前引物（35SF）和 35S 反向引物（35SR）来进行阳性鉴定（图 2）。利用组合 IntroF + 基因特异引物 F、R，intronR + 基因特异引物 F、R，35SF + 基因前、后引物，35SR + 基因前、后引物，明确判断片段的插入及方向。

对于 *J* 过量表达植株的检测，用 35SF + *J* R（*J* 基因的后引物）引物组合来进行鉴定。

基因表达检测：用 Trizol 提取转基因植株的总 RNA，反转录成 cDNA，然后用 *ACTIN* 作为内参基因对植物 RNA 的模板量进行调节，所有的半定量 RT-PCR 都扩增 28 个循环。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得

番茄子叶外植体经过预培养、共培养、筛选培养和生根后，共得到阳性转基因植株 27 株（表 2）。其中 *TAG1* RNAi 植株 8 株，*J* 过量表达 7 株，其他转基因植株共 12 株。以转基因株系的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，鉴定阳性植株，并对转基因株系进行转录水平的鉴定。结果表明，在 RNAi 试验中，除了 1 株 *TAG1* RNAi 的植株和野生型对照比较没有变化外，所有被检测植株的基因表达都被显著抑制（图 3）。过量表达转基因株系的 *J* 表达同野生型相比显著提高（图 4）。

表 2 所有的阳性转基因植株统计（共 27 株）
Table 2 A tally of kanamycin- and BASTA-resistant transgenic plants (27 plants in total)

载体名称 Vector name	阳性植株数 Plant number	RT 检测结果 Express level	表型 Phenotype	期望表型 Expected phenotype	文献 Reference
<i>TAG1</i> RNAi	8	表达下降 Down-regulated	雄蕊发育异常，雌蕊影响严重 Abnormal stamen and carpel development	雌蕊、雄蕊发育异常 Abnormal stamen and carpel development	Pnueli et al., 1994
<i>TAGL1</i> RNAi	5	表达下降 Down-regulated	未见明显表型 No significant phenotype	雌蕊、雄蕊发育异常 Abnormal stamen and carpel development	Busi et al., 2003
<i>TM3</i> RNAi	5	表达下降 Down-regulated	未见明显表型 No significant phenotype	影响开花时间 Flowering time changed	Pnueli et al., 1991
<i>LePI</i> RNAi	2	无明显变化 No significant change	未见明显表型 No significant phenotype	花瓣和雄蕊发育异常 Abnormal petals and stamen development	Goto & Meyerowitz, 1994
<i>J</i> 过量表达 <i>J</i> overexpress	7	表达上调 Up-regulated	植物花序增生，果形变为长圆形 Inflorescence and fruit shape changed	影响离区发育 Flower abscission zone development changed	Mao et al., 2000

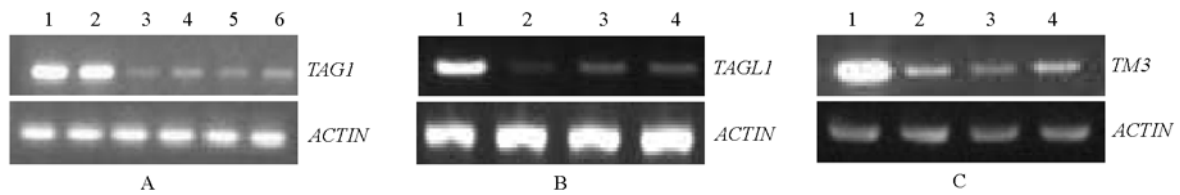


图 3 RNAi 转基因植株 RT-PCR 检测

A. *TAG1* RNAi 转基因植株的基因表达 (1. 野生型对照; 2~6. 转基因植株); B. *TAGL1* RNAi 转基因植株的基因表达 (1. 野生型对照; 2~4. 转基因植株); C. *TM3* RNAi 转基因植株的基因表达 (1. 野生型对照; 2~4. 转基因植株)。

Fig. 3 The RT-PCR results of RNAi transgenic plants

A. Gene expression in *TAG1* RNAi transgenic plants (1. Wild type; 2 - 6. Transgenic plants);
B. Gene expression in *TAGL1* RNAi transgenic plants (1. Wild type; 2 - 4. Transgenic plants);
C. Gene expression in *TM3* RNAi transgenic plants (1. Wild type; 2 - 4. Transgenic plants) .

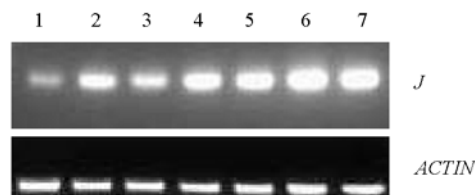


图 4 *J* 过量表达转基因植株 RT-PCR 检测

1. 野生型对照; 2~7. *J* 过量表达转基因植株的基因表达。

Fig. 4 The RT-PCR results of *J* overexpression transgenic plants

1. Wild type; 2 - 7. Gene expression of *J* overexpression transgenic plants.

2.2 *TAG1* 基因影响番茄花器官的发育

大田生长条件下观察转基因株系的表型, *TAG1* RNAi 转基因株系中有 4 株发生了明显的表型变化 (RT-PCR 检测表达水平下降的株系)。因为 *TAG1* 属于 C 类功能基因, 所以该基因的下调表达影响了第 3、4 轮花器官的发育 (Pnueli et al., 1994)。转基因植株整个花序上花的结构都发生了极为显著的改变, 主要表现在雄蕊和雌蕊上 (图 5, A)。在表型强烈的转基因植株中, 雄蕊完全失去野生型的形态, 而且高度不育, 不能产生花粉, 雌蕊由多个心皮混合组成, 失去了有限性 (图 5, B)。有的转基因株系中, 心皮由 3~5 个异常的心皮组成 (图 5, C)。成熟后的果实果皮不完整 (图 5, E)。进一步解剖发现, 异常的果实中包含多个无籽的小番茄 (图 5, F)。在异常心皮的横切面, 可以观察到多个无序的类似雄蕊和心皮相互嵌合的异常组织 (图 5, D), 而且在所有雌蕊的柱头都减小或消失。尽管花结构和育性发生明显变化, 但是所有转基因株系的花 (果) 柄离区发育正常。表明 *TAG1* 的表达量并不影响番茄花柄离区发育。

2.3 *J* 过量表达影响番茄花序和果实形状

经过 RT-PCR 验证, *J* 过量表达的转基因株系中, 发现了较明显的表型变化: 一方面, 花序结构发生了增生现象, 相对于野生型 (图 6, A) 不但花序的分支明显增多, 而且每个花序上的花数也显著增多 (图 6, B); 另一方面, 果实形状发生了显著变化, 野生型果实成熟后呈扁圆形, 而 *J* 过量表达植株果实成熟后呈长圆形 (图 6, D)。试验结果表明, *J* 不仅影响番茄的花序结构, 还影响果实形状。

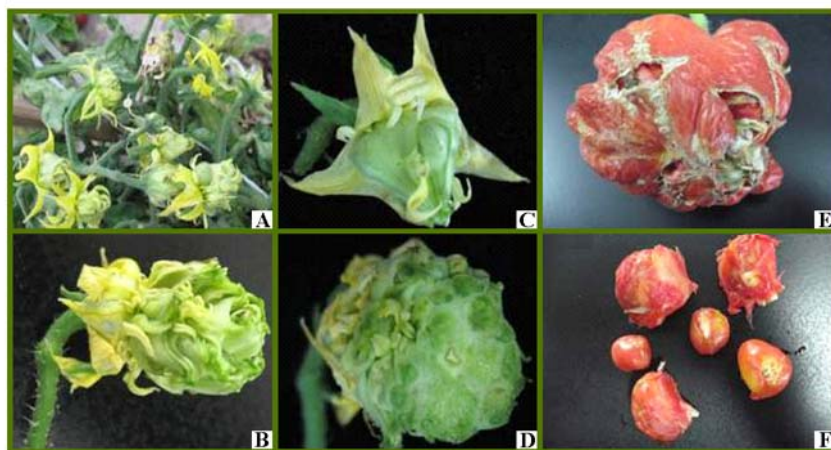


图 5 *TAG1* RNAi 植株的表型

A: 转基因植株的花序; B: 花的有限性完全丧失, 表现出雌雄蕊交替出现和嵌合表型; C: 转基因植株的花结构; D: B 图的横切面图; E: 果实成熟后具有多层果皮, 并且果实中含有多个小果实; F: E 图中果实解剖后显示包含多个小果实。

Fig. 5 Phenotype of *TAG1* RNAi transgenic lines

A: Inflorescence of transgenic line; B: Flower determinacy was lost and showed mixed stamens and carpels; C: Enlarged single flower of transgenic line; D: Cross section of the flower in B; E: Mature fruit of plant showed multiple peels and fruit; F: Small fruits were showed after dissection from the fruit in E.

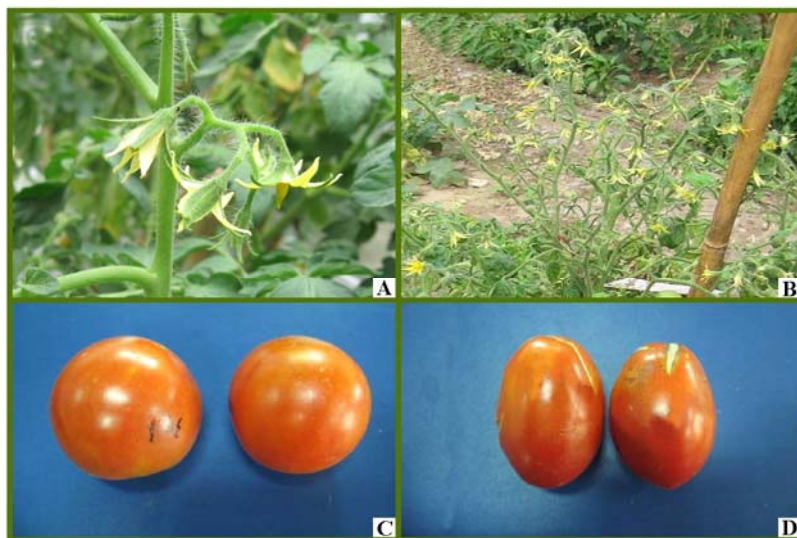


图 6 *J* 过量表达植株表型

A: 番茄野生型花序; B: *J* 过量表达植株花序由多个花构成, 而且花数明显增多; C: 野生型番茄果实呈现圆形; D: *J* 过量表达植株果实呈长圆形或椭圆形。

Fig. 6 Phenotype of *J* overexpressed line

A: Inflorescence of wild type tomato; B: Inflorescence of *J* overexpressed plant contain many branches with many flowers; C: Fruit shape in wild type tomato was round; D: Fruit shape in *J* overexpressed line was ellipse.

2.4 其它 MADS-box 基因 RNAi 转基因植株分析

在 RNAi 的转基因植株中, *TAG1* 和 *TM3* 也各自得到了 5 株阳性转基因植株, 对其在转录水平上的半定量 RT-PCR 鉴定, 发现两个基因的转录都被有效抑制 (图 3), 但是没有表现出明显的表型变化。原因可能是功能重复基因掩盖了其作用, 也可能是转录水平的下调未对蛋白合成量造成影响。对于植株内部生理性的变化需要进一步分析。

3 讨论

AG 是 *MADS* 基因家族中一个重要的 *C* 类功能基因, 控制植物第 3、4 轮花器官发育, 并决定植物花器官的有限性 (Yanofsky et al., 1990)。本试验中, 采用 RNAi 技术显著降低了转基因植株中 *TAG1* 的转录水平 (图 3), 转基因株系的第 3、4 轮花器官发生了显著变化。其主要特征是, 花器官的雄蕊、心皮重复出现, 表明所有花都不同程度地失去了有限性, 这与 *TAG1* 反义抑制植株的表型类似 (Pnueli et al., 1994), 敲除 *AG* 基因的拟南芥和金鱼草植株也观察到类似的表型 (Bowman et al., 1991; Bradley et al., 1993)。另外, 本试验转基因植株果实成熟时间显著推迟, 且成熟的果实内包含多个形态不规则的无籽小番茄。转基因植株育性丧失的原因可能是发育异常的雄蕊不能产生有功能的花粉。转基因株系的花柄发育都表现正常, 表明 *TAG1* 基因的降低不影响花柄离区的发育。结合酵母双杂交试验结果 (Leseberg et al., 2008), 推测 *TAG1* 和 *J* 蛋白之间的互作可能会影响番茄发育的其它方面, 如控制植物的花序生长有限性或果实形状等。

本试验中的 7 株 *J* 过量表达转基因株系中, 5 株表现出显著的花序增生现象。与野生型相比, 花序分支和各个分支上的花数明显增多 (图 6, B)。树木大桉 (*Eucalyptus grandis*) 中的 *EgrSVP* 是 *J* 的同源基因, 过量表达 *EgrSVP* 使花序从有限性、单花序变为无限性、多花序等表型, 与 *J* 过量表达相似 (Brill & Watson, 2004)。在番茄花柄离区发育过程中的另一个重要的基因 *JOINTLESS2* (*J2*), 是一个 *C* 端结构域磷酸酶类基因 (*C-TERMINAL PHOSPHATASE-LIKE GENE*), 突变体 *j2* 不能形成花柄离区, 且花序增生 (Yang et al., 2005)。在双突变体 *jj2* 中, 花序增生更为明显, 与 *J* 过量表达的表型相似。所以, *J* 和 *J2* 都影响番茄的花序结构, 说明番茄的离区发育和花序结构紧密相关; 在 *J* 过量表达植株中, 花柄离区发育表现正常但花序增生, 表明 *J* 除了控制离区发育外, 还影响植物的花序结构。

J 过量表达植株的另一个表型是果形发生变化。野生型和转基因果实的长宽比分别为 0.97 和 1.17, 差异显著。*OVATE* 和 *SUN* 是影响番茄果实形状的两个基因。*OVATE* 基因突变后形成一个提前终止的密码子, 使果实形状从圆形变为梨形 (Liu et al., 2002)。*SUN* 基因编码一个具有 IQ67 结构域的蛋白, 一个反转座子元件 *RIDER* 引起一个 24.7 kb 基因片段的复制, 使该基因表达上升, 从而引起果实形状变化 (Xiao et al., 2008)。*J* 过量表达所引起的果实形状变化与 *OVATE* 和 *SUN* 基因是否相关, 需要进一步验证。与野生型比较, 突变体 *j* 和 *j2* 的果实形状差别不大, 而双突变体 *jj2* 的果实形状呈现梨形, 这些表型变化表明, *J* 和 *J2* 影响番茄果实形状发育。

TAG1 影响植物的雌雄蕊发育, 但本试验中的转基因植株表现正常, 可能是由于功能重复基因掩盖了其作用。可以利用同类基因的双突变体或多重突变体, 消除功能重复基因的掩盖作用。*TM3* 影响植物的开花时间, 本试验中并没有观察到显著差别, 可能是由于功能重复基因在起作用, 也可能由于不受控制的大田外部环境影响了试验结果的精确性。该转基因植株需要进行进一步的温室鉴定。

RNAi 转基因试验和 *J* 过量表达对离区发育都没有影响。推测可能是有功能的 *J* 蛋白决定番茄离区发育, 而不是 *J* 的转录多少。影响番茄花柄离区发育的另一个基因 *LS* (*LATERAL SUPPRESSOR*) 编码一个 *VHIIID* 蛋白。*ls* 突变体部分花柄离区消失, 不会形成腋芽, 突变体的花缺少花瓣 (Schumacher et al., 1999)。*J*、*J2*、*LS* 是影响番茄离区发育的 3 个转录因子, 它们的突变能够影响花柄离区发育和花序结构。因此, 番茄花柄离区发育与花序发育密切相关, 且离区发育可能是花序发育的一个子单元。

References

- Adamczyk B J, Lehti-Shiu M D, Fernandez D E. 2007. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 50 (6): 1007 – 1019.
- Bowman J L, Drews G N, Meyerowitz E M. 1991. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell*, 3 (8): 749 – 758.
- Bradley D, Carpenter R, Sommer H, Hartley N, Coen E. 1993. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell*, 72 (1): 85 – 95.
- Brill E M, Watson J M. 2004. Ectopic expression of a *Eucalyptus grandis* SVP orthologue alters the flowering time of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 31: 217 – 224.
- Busi M V, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio S B, Valle E M, Zabaleta E. 2003. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Mol Biol*, 52 (4): 801 – 815.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons H J, Angenent G C, van Tunen A J. 1995. The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell*, 7 (11): 1859 – 1868.
- Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H, Sommer H. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo J*, 15 (16): 4330 – 4343.
- de Folter S, Immink R G, Kieffer M, Parenicova L, Henz S R, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater M M, Davies B, Angenent G C. 2005. Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell*, 17 (5): 1424 – 1433.
- Goto K, Meyerowitz E M. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev*, 8 (13): 1548 – 1560.
- Honma T, Goto K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 409 (6819): 525 – 529.
- Leseberg C H, Eissler C L, Wang X, Johns M A, Duvall M R, Mao L. 2008. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *J Exp Bot*, 59 (8): 2253 – 2265.
- Liu J, van Eck J, Cong B, Tanksley S D. 2002. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (20): 13302 – 13306.
- Mao L, Begum D, Chuang H W, Budiman M A, Szymkowiak E J, Irish E E, Wing R A. 2000. *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature*, 406 (6798): 910 – 913.
- Pnueli L, Abu-Abeid M, Zamir D, Nacken W, Schwarz-Sommer Z, Lifschitz E. 1991. The MADS box gene family in tomato: Temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J*, 1 (2): 255 – 266.
- Pnueli L, Hareven D, Rounsley S D, Yanofsky M F, Lifschitz E. 1994. Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*, 6 (2): 163 – 173.
- Rosin F M, Hart J K, van Onckelen H, Hannapel D J. 2003. Suppression of a vegetative MADS box gene of potato activates axillary meristem development. *Plant Physiol*, 131 (4): 1613 – 1622.
- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K. 1999. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (1): 290 – 295.
- Sun H J, Uchii S, Watanabe S, Ezura H. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol*, 47 (3): 426 – 431.
- Tapia-Lopez R, Garcia-Ponce B, Dubrovsky J G, Garay-Arroyo A, Perez-Ruiz R V, Kim S H, Acevedo F, Pelaz S, Alvarez-Buylla E R. 2008. An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1* (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 146 (3): 1182 – 1192.
- Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (1): 75 – 85.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296 (5566): 343 – 346.
- Xiao H, Jiang N, Schaffner E, Stockinger E J, van der Knaap E. 2008. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, 319 (5869): 1527 – 1530.
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (10): 6263 – 6268.
- Yang T J, Lee S, Chang S B, Yu Y, de Jong H, Wing R A. 2005. In-depth sequence analysis of the tomato chromosome 12 centromeric region: Identification of a large CAA block and characterization of pericentromere retrotransposons. *Chromosoma*, 114 (2): 103 – 117.
- Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A, Meyerowitz E M. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346: 35 – 39.