

B类MADS-Box基因的系统发育与功能演化

陈磊, 翟笑雨, 徐启江*

东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: B类MADS-box基因是调控被子植物花器官发育ABC分子遗传模型中重要的功能基因。在被子植物系统发育史中发生了2次重要的基因倍增事件, 一是在被子植物起源之前通过重复产生*APETALA3*和*PISTILLATA*家系, 二是在被子植物出现之后在核心双子叶植物中出现的*TM6*和*euAP3*家系。B类基因主要调控花瓣和雄蕊的发育, 但是, 也在某些物种花器官的第1轮(萼片)和第4轮(心皮)中表达, 引起花器官的同源异型转换。B类基因的建立受同源/非同源基因的影响。本文对被子植物B类MADS-box基因的系统发育与功能演化及建立进行综述, 探讨了B类MADS-box基因在调控被子植物花部性状的发育和属性决定中的作用机制。

关键词: 被子植物; B类MADS-box基因; 系统发育; 功能演化; 功能建立

The Phylogeny and Functional Evolution of B-Class MADS-Box Genes

CHEN Lei, ZHAI Xiao-Yu, XU Qi-Jiang*

The State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The B-class MADS-box gene is a kind of vital functional gene of the “ABC” model. The evolution of B-class genes runs through the entire plants evolutionary history. There are two critical points among B-class genes evolutionary history. One makes up the *APETALA3* and *PISTILLATA* genes by replicating before the origin of angiosperm. The other produces the *TM6* and *euAP3* genes in core dicot after angiosperm emerges. In plant groups, B-class genes mainly affect development in the second and third whorl floral organs namely the formation of petal and stamen, while they sometimes express in the first whorl (sepal) and fourth whorl (carpel) forming some petaloid organs to exercise relevant function among some species. Moreover, the expression of B-class is influenced by homologous/non-homologous genes. This review summarizes the phylogeny, functional evolution and establishment of B-class MADS-box gene in angiosperm. This review will assist in following angiosperm B-class MADS-box genes research.

Key words: angiosperm; B-class MADS-box gene; phylogeny; functional evolution; functional establishment

花是被子植物特有的繁殖器官。典型被子植物的花由4轮器官构成, 从外到内依次是花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊。作为生殖器官, 雄蕊和雌蕊是所有被子植物类群花的核心结构, 然而, 并不是所有的花都有形态分明的萼片和花瓣, 有些植物类群特别是基部被子植物和单子叶植物的花被未分化或逐渐分化, 呈轮状或螺旋状排列。从进化发育(evo-devo)遗传学角度深入解析花器官发生、发育的分子调控机理, 将有助于破解关于被子植物花起源及其快速多样性分化的达尔文“难解之谜(abominable mystery)” (Frohlich 2006)。

花器官发育的ABCE理论模型阐释了花器官同源异型基因(A、B、C和E)决定4轮花器官特征属性的分子机制(Coen和Meyerowitz 1991; Purugganan等1995; Theißen和Saedler 1995, 2001; Theißen

等2000; Litt和Kramer 2010)。A+E功能基因控制萼片发育; A+B+E功能基因控制花瓣发育; B+C+E功能基因控制雄蕊发育; C+E功能基因控制雌蕊发育。这一模型还提出A和C功能基因相互拮抗, A功能基因抑制C功能基因在第1、2轮花器官中表达, C功能基因抑制A功能基因在第3、4轮花器官中表达。除A类基因*APETALA2* (*AP2*)属于*AP2/EREBP*基因家族外(Riechmann和Meyerowitz 1998), 其余的A类基因和所有的B、C、E基因均

收稿 2015-04-20 修定 2015-07-30

资助 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014EA03-01)、国家基础科学人才培养基金(J1210053)和林木遗传育种国家重点实验室(东北林业大学)创新项目(2013B010)。

* 通讯作者(E-mail: qijiangxu@126.com; Tel: 0451-82191783)。

属于MADS-box转录因子基因家族(Theißen等2000),以高度有序的MADS蛋白质复合体形式(Smacznik等2012)结合在CArG [一致性序列: 5'-CC(A/T)₆GG-3']序列上而激活靶基因的表达,如*FD* (Kaufmann等2010)和*UNUSUAL FLORAL ORGANSCRABS CLAW* (Wuest等2012)。

依据ABCE模型, B类MADS-box基因例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *APETALA3* (*AP3*)和*PISTILLATA* (*PI*)在花瓣和雄蕊属性决定与发育过程中发挥关键作用(Causier等2010a; Zahn等2006)。B功能基因突变会引起花瓣转化为萼片、雄蕊转化为心皮的同源异型转化表型。决定花器官特征属性的MADS-box基因经历了大量基因复增事件,通过编码序列和(或)表达区域的改变而发生亚功能化和新功能化,进而导致被子植物花形态结构的多样性(Force等1999; Irish和Litt 2005; Moore等2005; Becker和Theißen 2003)。由于在决定被子植物特有的花器官——花瓣的特征属性方面, B功能基因发挥着关键作用, 因此, 这些基因在进化过程所经历的变化, 可能是了解MADS-box基因在被子植物进化史中系统发育特征的关键要素。本文综述了B类MADS-box基因的系统发育及其功能分化的研究进展。

1 被子植物B类MADS-box基因的系统发育

被子植物的B类MADS-box基因包括*APETALA3/DEFICIENS* (Jack等1992; Sommer等1990)和*PISTILLATA/GLOBOSA* (Goto和Meyerowitz 1994; Tröbner等1992)两个进化系。基于序列多样性分析可知, 这2个进化系在1.9~2.6亿年间即现存被子植物起源之前, 由一个祖先基因经历2次大的基因复增事件而产生(Doyle 1994; Theißen等1996, 2000; Purugganan 1997; Kramer等1998; Lamb和Irish 2003; Kim等2004; Stellari等2004; Hernandez-Hernandez等2007)。第1次发生在现存的被子植物与裸子植物分开之前, B类祖先基因通过基因复制产生了*AP3* (*paleoAP3*型)和*PI*两个分支。第2次基因复增事件发生在核心真双子叶植物起源之前, *paleoAP3*型基因通过复制产生了*TM6* (*TOMATO MADS-BOX GENE6*)和*euAP3*分支(Kramer等1998, 2006; Kramer和Irish 1999; Causier等2010b)。B功能基因每个进化系编码的MADS蛋白在其C末

端具有特异的保守基序, 例如PI基序(MPFx-FRVQPxQPNLQE)、PI衍生基序(FxFRLOP-SQPNLH)、*paleoAP3*基序(YGxHDLRLA)和*euAP3*基序(SDLTTFALLE) (Kramer等1998) (图1)。氨基酸序列的高度保守性表明, C末端基序对于*AP3*和PI蛋白质执行特定功能至关重要。

1.1 *AP3/DEF*类基因的系统发育

依据高度保守的C末端序列, *AP3/DEF*类基因可划分为*euAP3*、*TM6*和*paleoAP3*分支(Kramer等1998) (图2-A), 这些分支是*AP3*进化系通过多次小规模基因复增事件而产生(Di Stilio等2005; Kim等2005)。 *euAP3*分支存在于核心真双子叶植物, *paleoAP3*分支则存在于基部被子植物、单子叶植物、木兰科植物中, 是植物进化过程中的原始因子(Kramer等1998, 2006; Vandenbussche等2003a), 而*TM6*则被看作是核心真双子叶植物中的*paleoAP3*型基因。

*paleoAP3*型基因是在现存的被子植物与裸子植物分开之前, 由B类祖先基因通过复增而产生的(Kramer等1998; Theißen等2000), 其成员包括从低等核心双子叶植物、木兰科双子叶植物和单子叶植物中鉴定出来的*AP3*直系同源基因(Kramer等1998)。 *paleoAP3*直系同源蛋白质的C末端具有保守的PI衍生基序和*paleoAP3*基序。在核心真双子叶植物起源之前, *paleoAP3*型基因进一步复增, 产生了*TM6*和*euAP3*两个亚分支(Kramer等1998, 2000; Kramer和Irish 1999)。 *TM6*型基因产物在C末端保留了PI衍生基序和*paleoAP3*基序。而*euAP3*型基因产物在保留PI衍生基序的同时, 由于移码突变而使*paleoAP3*基序转变为*euAP3*基序(Vandenbussche等2003b)。但是, 也有研究者认为, *euAP3*基序是由于在编码*paleoAP3*基序的核苷酸序列中缺失1个碱基引起翻译移码而产生的(Kramer等2006)。

由于*paleoAP3*分支与*TM6*分支在序列上具有较高的一致性, C-末端结构域都有*paleoAP3*基序, 因此, 从高等真双子叶植物中鉴定出来的*euAP3*是一类趋异旁系同源基因(Irish 2006; Litt和Kramer 2010)。关于B类基因C末端基序的功能目前存在矛盾的研究结果, 一种观点认为这些基序没有任何生化功能, 在决定花瓣和雄蕊特征属性方面,

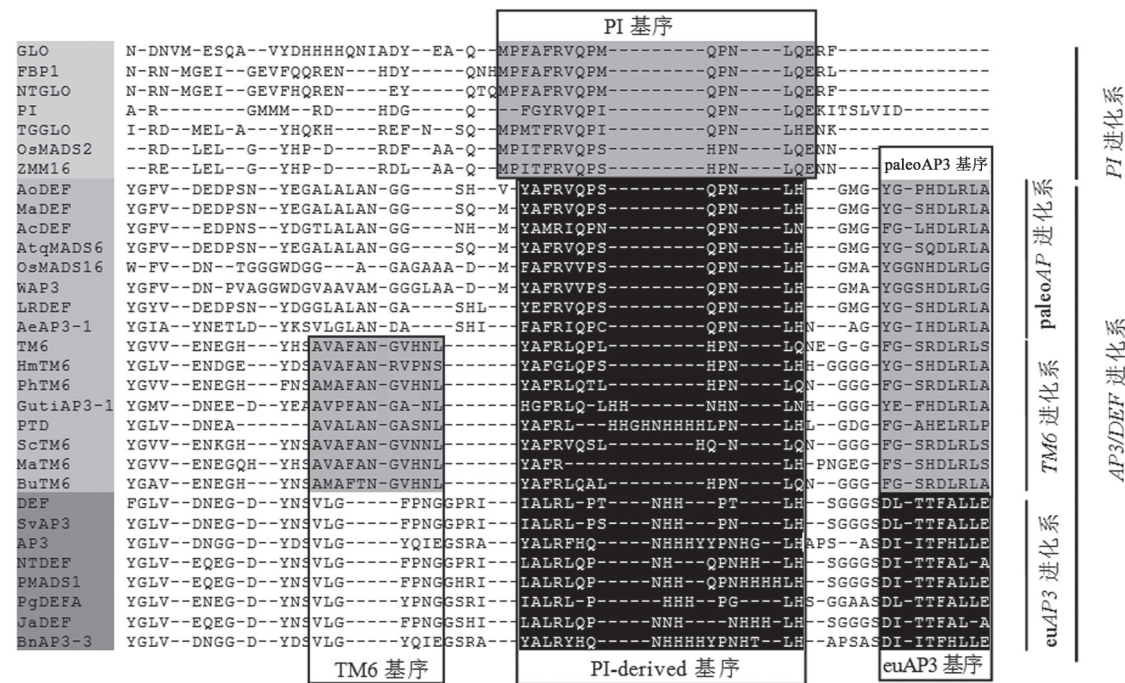


图1 B类MADS蛋白的C末端基序
Fig.1 The C-terminal motif of B-class MADS-box protein

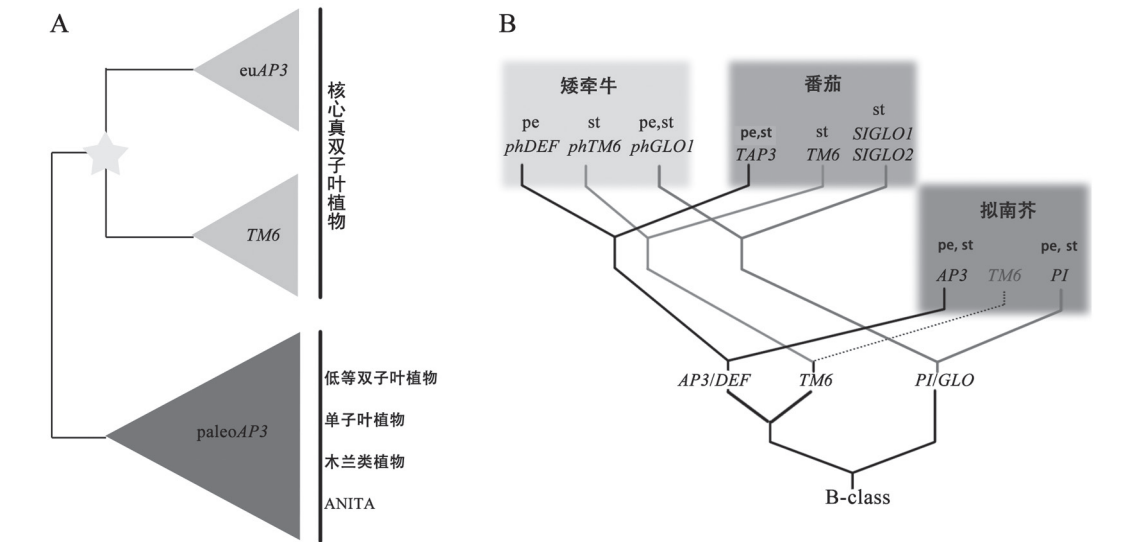


图2 被子植物B类MADS-box基因系统发育(A)及在模式植物中的作用(B)
Fig.2 The phylogeny of B-class MADS-box genes in angiosperm (A) and the roles in model plants (B)
参考Airoidi和Davies (2012)、Litt和Kramer (2010)文献修改。pe: 花瓣; st: 雄蕊; 虚线代表拟南芥中无TM6。

euAP3型蛋白质的MIK区比C末端功能重要(Pi-warzyk等2007; Su等2008)。另一种观点认为这些基序是B类基因发挥作用的关键, C末端基序缺失的AP3基因不能恢复拟南芥ap3突变体表型(Lamb

和Irish 2003)。这些研究结论的矛盾性在一定程度上是由于用于研究的靶基因在转基因株系中的表达水平不同造成的, 较高的表达水平可能会补偿C末端基序的改变, 或许在高度有序的蛋白质复合

体中, MADS-box蛋白质的C末端基序在功能上存在冗余。

研究显示, *TM6*进化系在模式植物拟南芥和金鱼草(*Antirrhinum majus*)中丢失(Causier等2010b), 但是在茄科植物例如矮牵牛(*Petunia hybrida*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)中同时存在*AP3*基因和*TM6*基因(图2-B), 且*TM6*直系同源基因在雄蕊和心皮中高水平表达, 说明*TM6*基因在决定雄蕊特征属性方面与其旁系同源基因*euAP3*存在功能冗余。尽管在花瓣中未检测到*TM6*基因的表达, 但该基因能够恢复*euAP3*突变体的花瓣缺陷表型(Vandenbussche等2004; de Martino等2006; Rijpkema等2006)。TM6与*euAP3*生化方面的差异决定了这些蛋白质与茄科特异PI蛋白质形成二聚体的能力, 而不是由于C末端基序的差异。而且, 在番木瓜中只存在*TM6*基因, *AP3*进化系丢失, 说明*AP3/TM6*旁系同源基因同时存在或只存在其一, 均能形成正常结构的花(Causier等2010b)。因此, *TM6*显然应该具备决定花瓣特征属性的功能, 但是, 在其他植物类群的情况是否确实如此, 还有待于深入研究。

1.2 *PI/GLO*类基因的系统发育

相对于*AP3/DEF*进化系而言, 大多数植物的*PI/GLO*类基因并没有发生频繁的基因复增事件(Kramer等1998)。但是, 在某些植物中也会发生复制而产生旁系同源基因, 如山茱萸(*Cornus officinalis*)的*CorPI-A*和*CorPI-B*基因, 两者存在高度分化的内含子序列(Feng等2012)。在单子叶植物中, *PI*进化系经历了多次复增事件, 而*AP3*进化系并没有发生基因复增, 表明单子叶植物的*AP3*进化系受到较强的进化约束(Winter等2002)。在基部双子叶植物中, 许多*PI*复增事件是相对独立发生的, 而*AP3*进化系在经过1~2次基因复增事件后保留1个拷贝, 这些复增事件发生在毛茛科植物进化的早期(Kramer等1998; Kramer和Irish 1999, 2000)。

*PI/GLO*进化系基因编码的蛋白质在其C末端包含16个氨基酸的PI基序(MPFAFRVQP-MQPNLQE) (Kramer等1998), 对于PI基序的功能同样存在相异的研究结果。与过表达全长*PI*基因的遗传转化植株相比, 在野生型拟南芥植株中过表达缺失PI基序的*PI*基因并不能使转基因植株呈现功能获得性表型, 说明PI基序是PI蛋白功能特异

性的关键(Lamb和Irish 2003)。另有研究结果显示, 在野生型拟南芥植株中过表达全长或缺失C末端功能域的*PI*基因, 转基因株系均出现萼片转化为花瓣的表型。而缺失K3 α -螺旋和C末端结构域的PI蛋白将失去决定花器官特征属性的功能(Piwarzyk等2007)。豌豆(*Pisum sativum*)的*PsPI*基因本身缺少PI基序, 但是具有恢复拟南芥*pi*突变体表型的功能(Berbel等2005), 对蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) MtPI的研究结果同样说明PI类蛋白执行B功能并不需要C末端基序的参与(Benlloch等2009)。花菱草(*Eschscholzia californica*)的SEI (EScaGLO)蛋白在缺失PI基序后, 仍然可以与DNA的CArG元件结合, 也能与其他MADS蛋白形成同源或异源二聚体, 但是无法介导包含B、C、E类MADS蛋白在内的高度有序复合体的形成(Lange等2013)。尽管PI基序在近1亿年的进化史中高度保守, 然而对于其功能的重要性仍存争议。PI基序N末端保守的数个氨基酸残基可能是实现MADS蛋白间高度有序作用所必需的, 在绝大多数被子植物中, MADS蛋白间的有序互作是花瓣及雄蕊特征属性确定的先决条件(Lange等2013)。

1.3 *Gymno B*类基因及*B_{sister}*类基因的系统发育

在首次证实裸子植物存在被子植物C类MADS-box基因的直系同源基因后, 系统发育分析表明B和C类基因的分离先于被子植物和裸子植物的分离(Tandre等1995)。因此, 现存裸子植物中也应该存在被子植物B类MADS-box基因的直系同源基因。随后研究者分别从买麻藤(*Gnetum gnemon*)、挪威云杉(*Picea abies*)、辐射松(*Pinus radiata*)、日本雪松(*Cryptomeria japonica*)中分离出了B类花器官同源异型基因, 这些基因被限定在雄性生殖器官中表达(Winter等1999; Sundström等1999; Mouradov等1999; Fukui等2001)。而*AG*类基因在雄性、雌性生殖器官中表达(Jager等2003; Rutledge等1998; Sundström等1999; Tandre等1995; Winter等1999), 表明种子植物决定生殖器官特性的遗传机制相似。在裸子植物和被子植物的最近共同祖先中*AG*类基因原始功能是区分生殖器官和营养器官, 而*DEF/GLO*类基因的原始功能是区分雄性生殖器官和雌性生殖器官(Theißen等2000; Winter等1999; Melzer等2010)。

对裸子植物买麻藤*GGM13*系统发育分析表明, 该基因与被子植物B类花器官基因以及裸子植物的直系同源基因*GGM2*类亲缘关系很近。由于B类MADS-box基因对雄性生殖器官(小孢子叶、雄蕊)的进化具有关键作用, 为详细解析*GGM13*类基因进化的保守性和重要性, 而将这类基因命名为*B_{sister}* (*B_s*)基因(Becker等2002)。随后, *B_s*进化系成员在被子植物中也被鉴定出来, 例如拟南芥*ARABIDOPSIS BSISTER* (*ABS*即*TRANSPARENT TESTA 16*, 以前命名*AGL32*)和*GORDITA* (*GOA*, 以前命名*AGL63*) (Nesi等2002; Kaufmann等2005; Prasad等2010; Erdmann等2010)、金鱼草*DEFICIENS 21* (*DEF21*) (Becker等2002)、矮牵牛*FLORAL BINDING PROTEIN 24* (*FBP24*) (de Folter等2006)、小麦(*Triticum aestivum*) *WBSis* (Yamada等2009)、玉米(*Zea mays*) *ZMM17* (Becker等2002)、水稻(*Oryza sativa*) *OsMADS29/30/OsMADS31* (Arora等2007)等。*B_s*基因的时空表达特异性在裸子植物和被子植物中具有高度保守性, 例如买麻藤、银杏(*Ginkgo biloba*) (Lovisetto等2013)、欧细辛(*Asarum europaeum*)、玉米、小麦、水稻、拟南芥、金鱼草、矮牵牛等, 几乎专一的在雌性生殖组织特别是胚珠中表达。而且, 该进化系成员仅存在于种子植物, 说明*B_s*基因进化系起源于4亿年前种子植物与蕨类植物分离之后, 即在3亿年前被子植物与裸子植物分离之前, B和*B_s*基因进化系由一个祖先基因通过复增而形成(Becker等2002; Stellari等2004)。*B_s*蛋白的I结构域较短, C末端结构域拥有PI衍生基序, 有的还包含末端的PaleoAP3基序, 这也充分证实了B和*B_s*基因的共源性(synapomorphy)。

2 B类MADS-box基因在被子植物中的功能演化

关键调控基因的复增及其功能趋异是形态多样性产生和进化的重要途径(Force等1999; Moore等2005)。花作为被子植物特有的创新性状和重要的生殖器官, 其形态多样性的基础是决定花器官特征属性、发育和确定性的MADS-box基因数目与功能的改变(Irish和Litt 2005; Kaufmann等2005)。编码调控花发育关键转录因子的MADS-box基因经历了大量基因复增事件, 通过编码序列和(或)表达区域的改变而发生亚功能化和新功能化, 进而导致被子植物花形态结构的多样性。作

为调控被子植物花瓣和雄蕊发育的B类MADS-box通过基因复增, 产生了表达模式及功能趋异的旁系同源基因并与被子植物花形态多样性有一定关联。

2.1 B功能的保守性

模式核心真双子叶植物拟南芥和金鱼草的B类基因*AP3/DEF*与*PI/GLO*对于确定花瓣和雄蕊特征属性发挥着主导作用(Whipple等2007; Irish 2009)。花发育早期阶段即萼片原基刚形成时, *AP3*与*DEF*于形成花瓣和雄蕊的区域持续表达, 花发育后期, 在萼片基部也能检测到*DEF*的低丰度转录, 在发育早期的心皮中也能检测到*DEF*基因的转录, 然而, 在发育晚期的胚珠中可检测到*AP3*的表达(Schwarz-Sommer等1992)。*ap3*和*def*突变体的花瓣转换为萼片、雄蕊转换为心皮(Jack等1992)。*PI*与*GLO*在2、3轮花器官中的表达模式类似于*AP3*与*DEF*, 相应的突变体表型一致(Tröbner等1992; Goto和Meyerowitz 1994)。在心皮发育的早期阶段, *PI*与*GLO*均存在低水平的表达。异位表达*AP3*可引起拟南芥花的心皮被雄蕊同源取代(Jack等1994)。其原因在于, *AP3*和*PI*蛋白同时存在是花瓣和雄蕊形成的必要条件, 由于*PI*在发育早期的心皮中正常表达, 加之*AP3*的异位表达, 从而引起同源转换(Zahn等2005)。其他核心双子叶植物、基部双子叶植物及单子叶植物的*AP3*与*PI*直系同源基因突变, 均会出现花瓣转换为萼片、雄蕊转换为心皮的同源转换表型, 说明B类基因*AP3/DEF*与*PI/GLO*的功能在被子植物进化史中具有高度保守性。

矮牵牛的*AP3/DEF*直系同源基因*PMADS1* (*PhDEF*)和*PhTM6*出现功能分化。*PMADS1*控制花瓣属性, *PhTM6*控制雄蕊属性, 而且*PhTM6*的表达不受*PI/GLO*直系同源基因*FBP1*和*PMADS2*的调节(Vandenbussche等2004)。虽然*FBP1*在萼片和花瓣中转录, 但是只在花瓣中检测到*FBP1*蛋白的存在(Immink等2003)。*PMADS2*的表达模式类似于*FBP1*, 在萼片中强表达、花瓣内中等表达。*FBP1*突变影响花瓣发育、*PMADS2*突变影响花药发育(Vandenbussche等2004), 这2个基因功能都缺失后, 突变体表型与*glo*或*pi*突变体表型相似, 即花瓣转换为萼片、雄蕊转换为心皮。有研究推断, 在基

部被子植物中 $AP3/DEF$ 与 PI/GLO 直系同源基因的功能是决定雄蕊属性,随着 $AP3/DEF$ 进化系在核心双子叶类群中发生复增,eu $AP3$ 分支获得决定花瓣属性的功能(Irish 2003)。然而,基因表达模式研究结果表明, $AP3/DEF$ 与 PI/GLO 直系同源基因可能在双子叶植物起源之前就参与了花被属性的确定。

2.2 B类MADS-box基因的功能趋异

B类基因复增后产生了与其表达模式相一致的亚功能化或新功能化,例如,苜蓿属植物的 $DEF/euAP3$ 直系同源基因 $NMH7$ 在根瘤区表达(Heard和Dunn 1995)。 $TM6$ 在叶、分生组织、花瓣、雄蕊、心皮和种子中低水平表达,在发育的果实中高水平表达(Busi等2003),推测该基因参与控制花和果实的发育。苹果(*Malus domestica*)的 $MdPI$ 仅在花中表达,但是可能参与调控果实发育(Yao等2001)。兰花的 $AP3/DEF$ 直系同源基因 $OMADS3$ 在花和叶中表达,对分生组织发育有一定影响。异位表达 $OMADS3$ 的拟南芥植株出现早花表型、分生组织确定性丧失、顶花包含2~3个心皮(Hsu和Yang 2002)。有些 $AP3/DEF$ 与 PI/GLO 直系同源基因在花及非花器官中均表达,桉树(*Eucalyptus robusta*)的 PI/GLO 直系同源基因 $EGM2$ 在叶中微弱表达、在花器官中强表达(Southerton等1998);大丁草(*Gerbera anandria*)的 $GDEF1$ 和 $GDEF2$ 基因在叶、苞叶、花茎、花及根等器官内表达,但是 $GDEF2$ 的表达强度比较高(Yu等1999)。烟草(*Nicotiana tabacum*)的 $NtDEF$ 最初在整个花分生组织中表达,在发育后期则限定在萼片、花瓣、雄蕊和心皮原基中表达(Davies等1996)。菟葵(*Eranthis stellata*) $EhAP3$ 和 $EhPI$ 在叶、茎、花器官中表达(Skipper 2002)。玉米的 $ZMM16$ 在浆片、雄蕊、心皮中表达,在叶、根、幼苗中弱表达(Munster等2001)。决定洋酸浆(*Physalis floridana*)花瓣和雄蕊属性的 $PFGLO1$ 与 $PFDEF$ 也在雌蕊原基中表达,下调 $PFGLO1$ 与 $PFDEF$ 会引起 $PFAG$ 的上调表达。表明 $PFGLO1$ 和 $PFDEF$ 获得了决定雌蕊功能的新作用(Zhang等2015)。B类MADS-box基因还参与了雄蕊瓣化形态的形成,例如美人蕉(*Canna indica*)的 $CiGLO$ (Fu等2014)、树牡丹(*Paeonia suffruticosa*)的 $PsTM6$ (Shu等2012)。

此外,B类MADS-box基因通过进化获得性别决定功能。白麦瓶草(*Silene latifolia*)的 $SLAP3Y$ 定位于Y染色体上,仅在雄花芽中表达。在退化的雌蕊中低表达、花瓣内中等表达、雄蕊中强表达; $SLAP3A$ 在雄花芽发育的花瓣中表达水平较高,但是在雌花芽发育过程中, $SLAP3A$ 在花瓣中强表达、在花柱原基和子房内中度表达(Matsunaga等2003),表明 $SLAP3Y$ 在雌性同体向雌雄异株转变过程中发挥了作用。绝大多数 $AP3/DEF$ 与 PI/GLO 基因在内轮花被和雄蕊中表达,尽管马兜铃科和腊梅科的部分B类基因不在雄蕊中表达(Kramer和Irish 2000)。在非核心双子叶植物类群中, $AP3/DEF$ 与 PI/GLO 直系同源基因在萼片和心皮中表达水平充满了变数。

尽管在多轮花器官中存在不同水平的表达,paleo $AP3$ 型基因调控雄蕊发育的功能在被子植物中是高度保守的,但是其决定花瓣特征属性的功能还不确定。paleo $AP3$ 基序和eu $AP3$ 基序的重组型 $AP3$ 基因能够恢复 $ap3$ 突变体的雄蕊表型,但不能恢复花瓣表型(Lamb和Irish 2003)。然而,编码paleo $AP3$ 基序的 $SILKY$ 基因能够恢复 $ap3$ 突变体的雄蕊和花瓣表型(Whipple等2004)。有些基部被子植物的paleo $AP3$ 在雄蕊中高丰度表达,在花瓣原基中的表达水平则很低(Kramer和Irish 1999; Kim等2005; Zahn等2005)。功能分析表明,paleo $AP3$ 在禾本科植物的雄蕊和浆片发育过程中具有重要作用(Ambrose等2000; Nagasawa等2003; Xiao等2003)。对其他单子叶植物研究发现,异位过表达paleo $AP3$ 基因能恢复花瓣和雄蕊发育(Whipple等2004)。例如,罂粟(*Papaver somniferum*)的花瓣发育是由paleo $AP3$ 和 PI 共同决定的(Drea等2007)。

2.3 B_s 基因的功能

与B类基因不同, B_s 基因主要在雌雄生殖器官和发育的种子中表达(de Folter等2006; Yamada等2009),其调控胚珠(种子)发育的功能在近3亿年的进化史中高度保守。

拟南芥 ABS 基因在成熟胚珠内珠被的内皮细胞层表达(Mizzotti等2012)。 Abs ($tt16$)突变体表型表明该基因调控花色素积累和内珠被内皮层细胞的分化(Kaufmann等2005)。 ABS ($TT16$)与D类基因 $SEEDSTICK$ (STK)存在功能冗余, abs/stk 突变体的

种子无内种皮、胚囊积累大量淀粉、大多数种子无活力(Mizzotti等2012)。*GOA*在果实裂瓣和胎座隔膜中表达,通过调控细胞的伸长而控制果实生长,与*ABS*相比较,*GOA*在经历基因复增之后发生了新功能化(Erdmann等2010; Prasad等2010)。矮牵牛*FLORAL BINDING PROTEIN 24 (FBP24)*在胚珠原基、珠心和珠被中表达,在发育后期,该基因的表达被限定在成熟胚珠和种子的内种皮,与*ABS*功能相似(de Folter等2006)。小麦*WBS1*在胚珠内珠被的内皮细胞层表达(Yamada等2009),类似于*ABS*的表达模式(Mizzotti等2012)。但是,在珠心和外珠被中存在弱表达。玉米*ZMM17*最初在雌穗的所有器官原基中表达,在发育后,该基因的表达限定在胚珠和发育的抽穗丝中(Becker等2002)。水稻*OsMADS29*在发育的种子中表达,通过调控母体组织的细胞退化而在种子发育过程中发挥作用(Yang等2012)。*B₃*调控果实发育方面的功能在裸子植物和被子植物中都得到保留(Lovisetto等2013),但不同植物的*B₃*可能存在特异性。与调控胚珠(种子)发育的保守功能相比,双子叶植物的*B₃*基因具有较广泛的表达区域,可调控色素积累、决定胚珠属性,这表明*B₃*基因在被子植物进化历程中经历了基因复增事件,在不同类群中发生了亚功能化和新功能化,从而控制种子发育的不同方面。

2.4 B类MADS-box基因调控萼片花瓣化的功能

大多数单子叶植物都具有花瓣化的器官来取代第1轮绿色萼片,如郁金香(*Tulipa gesneriana*)属植物,结果导致第1、2轮花器官转变为花被片(van Tunen等1993)。其分子基础在于B类基因表达区域扩张到第1轮花器官。如郁金香的B类基因在第1、2、3轮花器官中均被检测到(Kanno等2003);蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*) (Tsai等2004, 2005)、石斛兰(*Dendrobium nobile*) (Xu等2006)和番红花(*Crocus sativus*) (Tsafaris等2006)的B类基因也在第1轮中表达而产生2层花瓣化的器官;六出花(*Alstroemeria ligtu*)具2层花瓣状的被片,其B类基因包含*AlsDEFa*、*AlsDEF6*和*AlsGLO*,前者在2、3轮表达,后两者在1、2、3轮表达(Hirai等2007);红花玉兰(*Magnolia wufengensis*) B类相关基因*MAwuAP3-1/2*可以在其花瓣化的被片中检测到(Jing等2014);百子莲(*Agapanthus praecox*)的原位

杂交分析发现花瓣化的被片原基也可以检测到B类基因的表达(Nakamura等2005)。但是, B类基因扩张到第1轮表达并不是对每一种植物花瓣化器官的形成都适用。有些植物的花瓣化器官中并没有B类基因的表达,如芦笋(*Asparagus officinalis*) B类基因只在内层被片和雄蕊原基中被检测到,外层花被片中并没有B类基因的表达,却可以表现出器官花瓣化的表型(Park等2003, 2004)。红萼藤(*Rhodochiton atrosanguineus*)花瓣化的萼片,通过扫描电子显微镜观察发现该花瓣化的器官与花瓣的表皮细胞构造上存在着较大的差别,只是颜色上与花瓣类似。该性状的形成是由多种机制共同调控完成的(但不包含B类基因),例如花青素含量变化导致表皮细胞颜色加深,与花瓣颜色一致(Weiss 2000; Whittall等2006)。

3 B类基因功能建立的机制

*euAP3*及绝大多数*paleoAP3*进化系成员编码的蛋白质可与PI形成异源二聚体而调控花瓣和雄蕊的发育(Schwarz-Sommer等1992; Tröbner等1992; Vandenbussche等2004; Yao等2008)。然而,裸子植物的B功能蛋白以及非草本单子叶植物的*paleoAP3*和PI蛋白能以同源二聚体的形式发挥作用(Winter等1999, 2002; Tzeng和Yang 2001; Hsu和Yang 2002; Kanno等2003; Tsai等2005; Chang等2010)。*paleoAP3*的直系同源蛋白质LMADS1的*paleoAP3*和PI衍生基序是形成同源二聚体所必需的(Tzeng等2004)。PI直系同源蛋白的PI基序是否参与同源二聚体的形成以及对于PI直系同源蛋白发挥功能的重要性还不确定。麝香百合(*Lilium longiflorum*)的PI进化系基因LMADS8和LMADS9编码的蛋白质均能形成同源二聚体,但是LMADS8同源二聚体与靶基因CARG1元件的结合能力强于LMADS9同源二聚体。与LMADS8相比,LMADS9的C末端缺失包括PI基序在内29个氨基酸。在花发育的整个过程中,最外2层花被中均能检测到LMADS8/9 mRNA信号,但是,只有在幼小花蕾阶段才能在雄蕊中检测到LMADS8/9 mRNA信号。遗传转化试验结果表明,麝香百合PI进化系蛋白的PI基序对于调控花被形成具有重要作用(Chen等2012)。然而, B类MADS-box蛋白形成同源二聚体能力在单子叶植物类群并不保守。玉米的AP3直

系同源蛋白Silky1只能与PI直系同源蛋白Zmm16形成异源二聚体(Whipple等2004)。

表达区域的重叠性及相似的突变体表型显示AP3/DEF与PI/GLO具有紧密的协调效应。*pi (glo)*突变体的AP3 (DEF)基因及*ap3 (def)*突变体的PI (GLO)基因转录水平下降(Goto和Meyerowitz 1994),表明AP3/DEF与PI/GLO的表达受到彼此调控。AP3/DEF与PI/GLO蛋白形成异源二聚体而调控自身的转录(Samach等1997),因此,单基因的功能缺失会在很大程度上影响其旁系同源基因功能的发挥。矮牵牛的AP3/DEF直系同源基因*pMADS1*的异位表达能够激活PI/GLO的直系同源基因*pMADS2*和*FBP1*在萼片中表达(Halter等1994)。*pMADS1*蛋白可以与FBP1及*pMADS2*蛋白相互作用。但是,PhTM6与*pMADS2*蛋白具有强相互作用,而与FBP1间无或弱相互作用(Vandenbussche等2004)。

目前,兰科许多种类的AP3类和PI类基因已被鉴定(Hsu和Yang 2002; Tsai等2004, 2005; Xu等2006; Mondragón-Palomino等2009; Chang等2010; Pan等2011)。其中,所有的AP3类基因都属于paleoAP3家系,并可以分为4类,分别为:AP3A1 (包含*PeMADS3*)、AP3A2 (包含*PeMADS4*)、AP3B1 (包含*PeMADS2*)和AP3B2 (包含*PeMADS5*) (图3)。除了C末端被删除的AP3B2家系外,所有的AP3同系物在C末端都包含PI衍生基序和paleoAP3基序(Mondragón-Palomino等2009)。关于唇瓣的发育,蝴蝶兰中*PeMADS4*在唇瓣中被特异性的检测到,因此认为*PeMADS4*对兰花唇瓣的演化具有重要的

作用(Tsai等2004, 2005)。研究者对4个兰花亚科(除了拟兰亚科) 11个种的B类MADS-box基因进行统计归纳并分析这些基因的表达区域,提出兰花同源异型花被片(homeotic orchid tepal, HOT)模型。在该模型中PI和AP3B类基因决定萼片的形成,PI、AP3A1和AP3B类基因共同在花序发育阶段控制侧生花瓣的形成。然而,PI、AP3A1、AP3A2类基因和AGL6类(C类基因)在花芽发育阶段共同调控唇瓣发育(Pan等2011)。“HOT模型”与“兰花密码”(orchid code)类似(Mondragón-Palomino和Theissen 2008),但“HOT模型”在*PeMADS4* (AP3A2类)决定唇瓣形成方面提供了更详尽的解释。

异源蛋白如拟南芥中A功能蛋白APETALA2 (AP2)、TOPLESS (TPL)和HISTONE DEACETYLASE 19 (HDA19)形成复合体抑制AP3和PI在萼片表达。AP3与PI也会抑制心皮特征基因的表达,例如*CRABS CLAW* (CRC) (图4)。黄瓜的*CsGAIP* (赤霉素转导因子*DELLA*的同源基因)可以转录B类基因抑制物,抑制B类基因的表达(Zhang等2014)。一些具细胞质不育(cytoplasmic male sterility, CMS)特性的植物如番茄、胡萝卜(*Daucus carota*)和烟草,研究发现这些植物B类基因的表达受多种CMS系统的干扰(Zheng等2012; Hama等2004),与线粒体基因相关的CMS可以调节核基因的表达(其中包括B类基因),造成发育过程中花器官形态的转变(Chase 2007; Hanson和Bentolila 2004)。综上所述,B类基因的表达受多种类型基因的调控,这种基因之间的互作造就花型的多样性以更好的适应环境,满足植物体自身进化所需的条件。

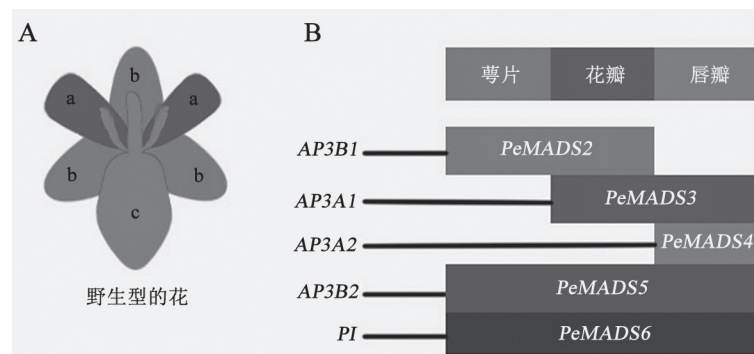


图3 蝴蝶兰花型结构图及其野生型花被片B类MADS-box基因表达模式

Fig.3 Flower pattern and expression of B-class MADS-box genes in perianth of wild type flower of *Phalaenopsis amabilis* 参考Tsai等(2014)文献修改。A: 花型结构; 其中, a: 侧生花瓣; b: 萼片; c: 唇瓣。B: 基因表达模式(HOT模型); *PeMADS4*仅在唇瓣中表达。

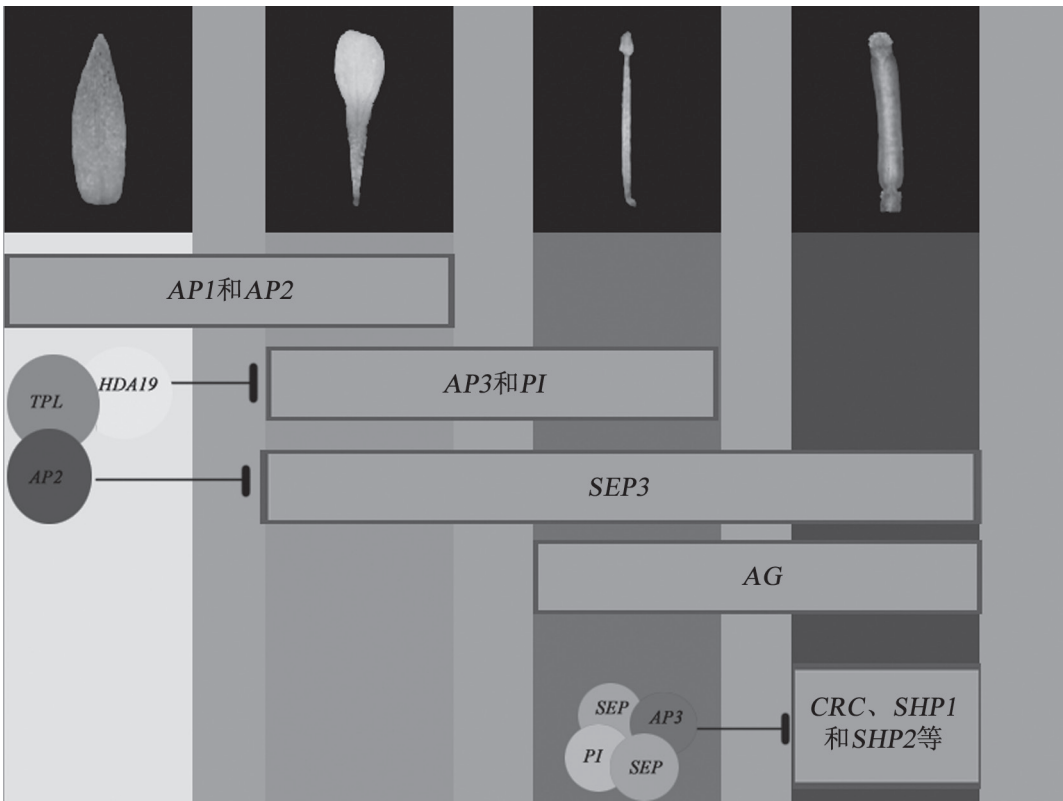


图4 拟南芥B类MADS-box基因表达区域

Fig.4 The expression pattern of B-class MADS-box gene in *Arabidopsis thaliana*

参考Ó'Maoiléidigh等(2014)文献修改。花轮数由不同深浅色块代表, 分别由白色(第1轮)到深黑(第4轮)指代, 灰色底纹代表器官边界, 圆形代表蛋白, 方框代表基因, 钝型箭头指抑制表达。

4 结论与展望

B类MADS-box基因是花瓣和雄蕊发育的关键调节因子, 其原始功能是区分植物的性别(Wang等2010)。在裸子植物中, 可由DEF/GLO类基因的不同表达来将雄性个体从雌性个体中筛选出来, 也可以通过改变基因的表达来实现雌雄个体的转化(Melzer等2010)。B₂基因更多的是决定裸子植物胚乳的发育。B类基因是研究植物基因进化的范例, 尤其为依靠复增或移码突变而导致功能趋异(新功能化和亚功能化)实现基因进化, 提供进化模式的例证。在被子植物进化过程中B类基因经历了2次关键的基因复制事件, 结果产生了PI、euAP3和TM6进化系(Kramer等1998; Kramer和Irish 1999)。当今研究者普遍认为B类基因的进化延续至TM6基因, 而euAP3仅仅被认为是一种局限在核心真双子叶植物中的新型基因, 主要是因为TM6在其C末端保留了祖先基因paleoAP3的paleoAP3基

序, 而euAP3则形成了新的euAP3基序(Kramer等2006)。

通过对模式植物拟南芥和金鱼草的研究, B类基因主要在2、3轮花器官表达决定花瓣和雄蕊的发育。但单子叶和双子叶植物类群中不同种类的花的花型结构迥异, 包括花被由花瓣状的被片种类(如郁金香)、具有完全分化的萼片和花瓣的种类, 如紫露草(*Tradescantia reflexa*)以及具有唇瓣的种类(兰花)等, 与之相应的B类基因的表达模式也存在很大的差异(Whipple等2004; Chung等1994; Xu等2006; Kanno等2003)。由于B类基因的表达扩展到邻近的轮数, 从而形成花瓣状的花被片、萼片或雄蕊, 为“边界滑动模型”提供了证据。然而, 有些被子植物的花表型结构及B类基因表达模式与传统的ABC模型及其之后修改的模型都相矛盾, 其可能解释如下: 其一, 每个旁系同源基因存在额外的拷贝且呈现异常的表达模式, 如芦笋、番红

花和葡萄风信子(*Muscari botryoides*)等(Stellari等2004);其二,B类基因存在转录后调控机制或编码的转录因子缺失,MADS-box基因并不总是在其mRNA表达的区域发挥功能(Tzeng和Yang 2001)。后者可能包括其他同源或非同源基因的影响。

被子植物花器官特征属性决定是多MADS-box基因协同调控的结果,其复杂性以及非特异性一直是科研的难题。近期研究发现microRNA(miRNA)也会影响B功能花器官基因的表达,如意大利红门兰花(*Orchis italica*)的被片和唇瓣发育过程中,DEF基因起着关键的作用,研究发现它是miRNA5179的靶基因(Aceto等2014)。因此,花器官发育的研究也需要结合表观遗传学的研究思路。未来的工作应将B类MADS-box基因的功能建立与表观遗传学的研究相结合,将表观遗传方面的研究如miRNAs、DNA甲基化等与已知知识融合,以求对花发育进行更深入的研究。探究B类MADS-box基因在花瓣、雄蕊和一些花瓣化器官形成的过程中所发挥的功能,可以更好的对花型各异的植物进行追本溯源,能够为调控被子植物花器官功能的研究奠定基础。

参考文献

- Aceto S, Sica M, De Paolo S, D'Argenio V, Cantiello P, Salvatore F, Gaudio L (2014). The analysis of the inflorescence miRNome of the orchid *Orchis italica* reveals a DEF-like MADS-box gene as a new miRNA target. *PLoS ONE*, 9 (5): e97839
- Airoidi CA, Davies B (2012). Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors. *J Genet Genomics*, 39 (4): 157~165
- Ambrose BA, Lerner DR, Ciceri P, Padilla CM, Yanofsky MF, Schmidt RJ (2000). Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol Cell*, 5 (3): 569~579
- Arora R, Agarwal P, Ray S, Singh A, Singh V, Tyagi AK, Kapoor S (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*, 8: 242
- Becker A, Kaufmann K, Freialdenhoven A, Vincent C, Li MA, Saedler H, Theißen G (2002). A novel MADS-box gene subfamily with a sister-group relationship to class B floral homeotic genes. *Mol Genet Genomics*, 266 (6): 942~950
- Becker A, Theißen G (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 29 (3): 464~489
- Benlloch R, Roque E, Ferrándiz C, Cosson V, Caballero T, Penmetsa RV, Madueño F (2009). Analysis of B function in legumes: PISTILLATA proteins do not require the PI motif for floral organ development in *Medicago truncatula*. *Plant J*, 60 (1): 102~111
- Berbel A, Navarro C, Ferrándiz C, Cañas LA, Beltrán JP, Madueño F (2005). Functional conservation of PISTILLATA activity in a pea homolog lacking the PI motif. *Plant Physiol*, 139 (1): 174~185
- Busi MV, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio SB, Valle EM, Zabaleta E (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Mol Biol*, 52: 801~815
- Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B (2010a). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol*, 21: 73~79
- Causier B, Castillo R, Xue Y, Schwarz-Sommer Z, Davies B (2010b). Tracing the evolution of the floral homeotic B- and C-function genes through genome synteny. *Mol Biol Evol*, 27: 2651e2664
- Chang YY, Kao NH, Li JY, Hsu WH, Liang YL, Wu JW, Yang CH (2010). Characterization of the possible roles for B class MADS box genes in regulation of perianth formation in orchid. *Plant Physiol*, 152: 837~853
- Chase CD (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *TRENDS Genet*, 23 (2): 81~90
- Chen MK, Hsieh WP, Yang CH (2012). Functional analysis reveals the possible role of the C-terminal sequences and PI motif in the function of lily (*Lilium longiflorum*) PISTILLATA (PI) orthologues. *J Exp Bot*, 63 (2): 941~961
- Chung YY, Kim SR, Finkel D, Yanofsky MF, An G (1994). Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol Biol*, 26 (2): 657~665
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353 (6339): 31~37
- Davies B, Di Rosa A, Eneva T, Saedler H, Sommer H (1996). Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes. *Plant J*, 10: 663~677
- de Folter S, Shchennikova AV, Franken J, Busscher M, Baskar R, Grossniklaus U, Angenent GZ, Immink RGH (2006). A B_{sister} MADS-box gene involved in ovule and seed development in petunia and *Arabidopsis*. *Plant J*, 47 (6): 934~946
- de Martino G, Pan I, Emmanuel E, Levy A, Irish VF (2006). Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell*, 18: 1833~1845
- Di Stilio VS, Kramer EM, Baum DA (2005). Floral MADS box genes and homeotic gender dimorphism in *Thalictrum dioicum* (Ranunculaceae): a new model for the study of dioecy. *Plant J*, 41 (5): 755~766
- Doyle JJ (1994). Evolution of a plant homeotic multigene family: toward connecting molecular systematic and molecular developmental genetics. *Syst Biol*, 43: 307~328
- Drea S, Hileman LC, De Martino G, Irish VF (2007). Functional analyses of genetic pathways controlling petal specification in *poppy*. *Development*, 134 (23): 4157~4166
- Erdmann R, Gramzow L, Melzer R, Theißen G, Becker A (2010).

- GORDITA (AGL63)* is a young paralog of the *Arabidopsis thaliana* B_{sister} MADS box gene *ABS (TT16)* that has undergone neofunctionalization. *Plant J*, 63: 914–924
- Feng CM, Liu X, Yu Y, Xie D, Franks RG, Xiang QYJ (2012). Evolution of bract development and B-class MADS box gene expression in petaloid bracts of *Cornus* s. l. (Cornaceae). *New Phytol*, 196 (2): 631–643
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151 (4): 1531–1545
- Frohlich MW (2006). Recent developments regarding the evolutionary origin of flowers. *Adv Bot Res*, 44: 63–127
- Fu Q, Liu H, Almeida AM, Kuang Y, Zou P, Liao J (2014). Molecular basis of floral petaloidy: insights from androecia of *Canna indica*. *AoB Plants*, 6: plu015
- Fukui M, Futamura N, Mukai Y, Wang Y, Nagao A, Shinohara K (2001). Ancestral MADS box genes in sugi, *Cryptomeria japonica*, D. Don (Taxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell Physiol*, 42: 566–575
- Goto K, Meyerowitz EM (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Gene Dev*, 8 (13): 1548–1560
- Halfter U, Ali N, Stockhaus J, Ren L, Chua NH (1994). Ectopic expression of a single homeotic gene, the *Petunia* gene *green petal*, is sufficient to convert sepals to petaloid organs. *EMBO J*, 13: 1443–1449
- Hama E, Takumi S, Ogihara Y, Murai K (2004). Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta*, 218 (5): 712–720
- Hanson MR, Bentolila S (2004). Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, 16: S154–S169
- Heard J, Dunn K (1995). Symbiotic induction of a MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 5273–5277
- Hernandez-Hernandez T, Martinez-Castilla LP, Alvarez-Buylla ER (2007). Functional diversification of B MADS-box homeotic regulators of flower development: adaptive evolution in protein–protein interaction domains after major gene duplication events. *Mol Biol Evol*, 24: 465–481
- Hirai M, Kamimura T, Kanno A (2007). The expression patterns of three class B genes in two distinctive whorls of petaloid tepals in *Alstroemeria ligtu*. *Plant Cell Physiol*, 48 (2): 310–321
- Hsu HF, Yang CH (2002). An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AP3*-like MADS gene regulates floral formation and initiation. *Plant Cell Physiol*, 43: 1198–1209
- Immink RG, Ferrario S, Busscher-Lange J, Kooiker M, Busscher M, Angenent GC (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol Gen Genomics*, 268: 598–606
- Irish VF (2003). The evolution of floral homeotic gene function. *Bioessays*, 25: 637–646
- Irish VF, Litt A (2005). Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment. *Curr Opin Genet Dev*, 15 (4): 454–460
- Irish VF (2006). Duplication, diversification, and comparative genetics of angiosperm MADS-box genes. *Adv Bot Res*, 44: 129–161
- Irish VF (2009). Evolution of petal identity. *J Exp Bot*, 60: 2517–2527
- Jack T, Brockman LL, Meyerowitz EM (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68 (4): 683–697
- Jack T, Fox GL, Meyerowitz EM (1994). *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell*, 76: 703–716
- Jager M, Hassanin A, Manuel M, Guyader HL, Deutsch J (2003). MADS-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the *AG-AMOUS* family. *Mol Biol Evol*, 20: 842–854
- Jing D, Liu Z, Zhang B, Ma J, Han Y, Chen F (2014). Two ancestral *APETALA3* homologs from the basal angiosperm *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae) can affect flower development of *Arabidopsis*. *Gene*, 537 (1): 100–107
- Kanno A, Sacki H, Kameya T, Saedler H, Theißen G (2003). Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Mol Biol*, 52: 831–841
- Kaufmann K, Anfang N, Saedler H, Theißen G (2005). Mutant analysis, protein–protein interactions and subcellular localization of the *Arabidopsis* B_{sister} (ABS) protein. *Mol Gen Genomics*, 274: 103–118
- Kaufmann K, Wellmer F, Muiño JM, Ferrier T, Wuest SE, Kumar V, Riechmann JL (2010). Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science*, 328 (5974): 85–89
- Kim S, Koh J, Yoo MJ, Kong H, Hu Y, Ma H, Soltis DE (2005). Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *Plant J*, 43 (5): 724–744
- Kim S, Yoo MJ, Albert VA, Farris JS, Soltis PS, Soltis DE (2004). Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: evolutionary and functional implications of a 260-million-year-old duplication. *Am J Bot*, 91: 2102–2118
- Kramer EM, Dorit RL, Irish VF (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics*, 149: 765–783
- Kramer EM, Irish VF (1999). Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature*, 399: 144–148
- Kramer EM, Irish VF (2000). Evolution of the petal and stamen developmental programs: evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. *Int J Plant Sci*, 161: S29–S40
- Kramer EM, Su HJ, Wu CC, Hu JM (2006). A simplified explanation for the frameshift mutation that created a novel C-terminal motif in the *APETALA3* gene lineage. *BMC Evol Biol*, 6 (1): 30
- Lamb RS, Irish VF (2003). Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 6558–6563
- Lange ML, Orashakova S, Lange S, Melzer R, Theißen G, Smyth DR, Becker A (2013). The *seirena* B class floral homeotic mutant of

- California Poppy (*Eschscholzia californica*) reveals a function of the enigmatic PI motif in the formation of specific multimeric MADS domain protein complexes. *Plant Cell*, 25 (2): 438–453
- Litt A, Kramer EM (2010). The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Semin Cell Dev Biol*, 21: 129–137
- Lovisetto A, Guzzo F, Busatto N, Casadoro G (2013). Gymnosperm B-sister genes may be involved in ovule/seed development and, in some species, in the growth of fleshy fruit-like structures. *Ann Bot*, 112 (3): 535–544
- Matsunaga S, Isono E, Kejnovsky E, Vyskot B, Dolezel J, Kawano S, Charlesworth D (2003). Duplicative transfer of a MADS box gene to a plant Y chromosome. *Mol Biol Evol*, 20: 1062–1069
- Melzer R, Wang YQ, Theißen G (2010). The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Semin Cell Dev Biol*, 21: 118–128
- Mizzotti C, Mendes MA, Caporali E, Schnittger A, Kater MM, Battaglia R, Colombo L (2012). The MADS box genes *SEEDSTICK* and *ARABIDOPSIS B_{sister}* play a maternal role in fertilization and seed development. *Plant J*, 70: 409–420
- Mondragón-Palomino M, Hiese L, Härter A, Koch MA, Theißen G (2009). Positive selection and ancient duplications in the evolution of class B floral homeotic genes of orchids and grasses. *BMC Evol Biol*, 9 (1): 81
- Mondragón-Palomino M, Theißen G (2008). MADS about the evolution of orchid flowers. *Trends Plant Sci*, 13 (2): 51–59
- Moore RC, Grant SR, Purugganan MD (2005). Molecular population genetics of redundant floral-regulatory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*, 22 (1): 91–103
- Mouradov A, Hamdorf B, Teasdale RD, Kim JT, Winter KU, Theißen G (1999). A *DEF/GLO*-like MADS-box gene from a gymnosperm: *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. *Dev Genet*, 25 (3): 245–252
- Munster T, Wingen LU, Faigl W, Werth S, Saedler H, Theißen G (2001). Characterization of three *GLOBOSA*-like MADS-box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene*, 262: 1–13
- Nagasawa N, Miyoshi M, Sano Y, Satoh H, Hirano H, Sakai H, Nagato Y (2003). *SUPERWOMAN1* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development*, 130 (4): 705–718
- Nakamura T, Fukuda T, Nakano M, Hasebe M, Kameya T, Kanno A (2005). The modified ABC model explains the development of the petaloid perianth of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Agapanthaceae) flowers. *Plant Mol Biol*, 58 (3): 435–445
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Stewart AJ, Jenkins GI, Caboche M, Lepiniec L (2002). The *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the *ARABIDOPSIS BSISTER* MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell*, 14: 2463–2479
- Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F (2014). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol*, 201 (1): 16–30
- Pan ZJ, Cheng CC, Tsai WC, Chung MC, Chen WH, Hu JM, Chen HH (2011). The duplicated B-class MADS-box genes display dualistic characters in orchid floral organ identity and growth. *Plant Cell Physiol*, 52 (9): 1515–1531
- Park JH, Ishikawa Y, Ochiai T, Kanno A, Kameya T (2004). Two *GLOBOSA*-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Physiol*, 45 (3): 325–332
- Park JH, Ishikawa Y, Yoshida R, Kanno A, Kameya T (2003). Expression of *AODEF*, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* L. *Plant Mol Biol*, 51 (6): 867–875
- Piwarzyk E, Yang YZ, Jack T (2007). Conserved C-terminal motifs of the *Arabidopsis* proteins APETALA3 and PISTILLATA are dispensable for floral organ identity function. *Plant Physiol*, 145: 1495–1505
- Prasad K, Zhang X, Tobón E, Ambrose BA (2010). The *Arabidopsis* B-sister MADS-box protein, GORDITA, represses fruit growth and contributes to integument development. *Plant J*, 62: 203–214
- Purugganan MD (1997). The MADS-box floral homeotic gene lineages predate the origin of seed plants: phylogenetic and molecular clock estimates. *J Mol Evol*, 45: 392–396
- Purugganan MD, Rounsley SD, Schmidt RJ, Yanofsky MF (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene. *Genetics*, 140 (1): 345–356
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998). The *AP2/EREBP* family of plant transcription factors. *Biol Chem*, 379: 633–646
- Rijkema AS, Royaert S, Zethof J, van der Weerden G, Gerats T, Vandebussche M (2006). Analysis of the *Petunia TM6* MADS box gene reveals functional divergence within the *DEF/AP3* lineage. *Plant Cell*, 18: 1819–1832
- Rutledge R, Regan S, Nicolas O, Fobert P, Cote C, Bosnich W, Kaufeldt C, Sunohara G, Seguin A, Stewart D (1998). Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant J*, 15: 625–634
- Samach A, Kohalmi SE, Motte P, Datla R, Haughn GW (1997). Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes. *Plant Cell*, 9: 559–570
- Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor PJ, Hansen R, Tetens F, Lonnig WE, Saedler H, Sommer H (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J*, 11: 251–263
- Shu Q, Wang L, Wu J, Du H, Liu ZA, Ren H, Zhang J (2012). Analysis of the formation of flower shapes in wild species and cultivars of tree peony using the MADS-box subfamily gene. *Gene*, 493 (1): 113–123
- Skipper M (2002). Genes from the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages are expressed in developing vascular bundles of the tuberos rhizome, flowering stem and flower primordia of *Eranthis hyemalis*. *Ann Bot*, 89: 83–88
- Smaczniak C, Immink RG, Muiño JM, Blanvillain R, Busscher M, Busscher-Lange J, Dinh QD, Liu S, Westphal AH, Boeren S et al (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor

- complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (5): 1560~1565
- Sommer H, Beltran JP, Huijser P, Pape H, Lönig WE, Saedler H, Schwarz-Sommer Z (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J*, 9 (3): 605~613
- Southerton SG, Marshall H, Mouradov A, Teasdale RD (1998). Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol*, 118: 365~372
- Stellari GM, Jaramillo MA, Kramer EM (2004). Evolution of the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of MADS-box-containing genes in the basal angiosperms. *Mol Biol Evol*, 21: 506~519
- Su K, Zhao S, Shan H, Kong H, Lu W, Theißen G, Chen Z, Meng Z (2008). The MIK region rather than the C-terminal domain of *AP3*-like class B floral homeotic proteins determines functional specificity in the development and evolution of petals. *New Phytol*, 178 (3): 544~558
- Sundström J, Carlsbecker A, Svensson ME, Svensson M, Johanson U, Theißen G, Engström P (1999). MADS-box genes active in developing pollen cones of Norway spruce (*Picea abies*) are homologous to the B-class floral homeotic genes in angiosperms. *Dev Genet*, 25 (3): 253~266
- Tandre K, Albert VA, Sundas A, Enstrom P (1995). Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol Biol*, 27: 69~78
- Theißen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Münster T, Saedler H (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol*, 42: 115~149
- Theißen G, Kim JT, Saedler H (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, 43: 484~516
- Theißen G, Saedler H (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr Opin Genet Dev*, 5 (5): 628~639
- Theißen G, Saedler H (2001). Floral quartets. *Nature*, 409 (6819): 469~471
- Tröbner W, Ramirez L, Motte P, Hue I, Huijser P, Lönig WE, Saedler H, Sommer H, Schwarz-Sommer Z (1992). *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J*, 11: 4693~4704
- Tsaftaris AS, Polidoros AN, Pasentsis K, Kalivas A (2006). Tepal formation and expression pattern of B-class paleo-*AP3*-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Sci*, 170 (2): 238~246
- Tsai WC, Kuoh CS, Chuang MH, Chen WH, Chen HH (2004). Four *DEF*-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol*, 45 (7): 831~844
- Tsai WC, Lee PF, Chen HI, Hsiao YY, Wei WJ, Pan ZJ, Chuang MH, Kuoh CS, Chen WH, Chen HH (2005). *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant Cell Physiol*, 46: 1125~1139.
- Tsai WC, Pan ZJ, Hsiao YY, Chen LJ, Liu ZJ (2014). Evolution and function of MADS-box genes involved in orchid floral development. *J Sys Evol*, 52 (4): 397~410
- Tzeng TY, Liu HC, Yang CH (2004). The C-terminal sequence of LMADS1 is essential for the formation of homodimers for B function proteins. *J Biol Chem*, 279: 10747~10755
- Tzeng TY, Yang CH (2001). A MADS box gene from lily (*Lilium longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with *PISTILLATA (PI)* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 42 (10): 1156~1168
- Vandenbussche M, Theißen G, Van de Peer Y, Gerats T (2003b). Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res*, 31 (15): 4401~4409
- Vandenbussche M, Zethof J, Royaert S, Weterings K, Gerats T (2004). The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell*, 16 (3): 741~754
- Vandenbussche M, Zethof J, Souer E, Koes R, Tornielli GB, Pezzotti M, Gerats T (2003a). Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require *SEPALLATA*-like MADS box genes in *petunia*. *Plant Cell*, 15 (11): 2680~2693
- van Tunen AJ, Eikelboom W, Angenent GC (1993). Floral organogenesis in *Tulipa*. *Flower News Lett*, 16: 33~38
- Wang YQ, Melzer R, Theißen G (2010). Molecular interactions of orthologues of floral homeotic proteins from the gymnosperm *Gnetum gnemon* provide a clue to the evolutionary origin of 'floral quartets'. *Plant J*, 64 (2): 177~190
- Weiss D (2000). Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol Plant*, 110 (2): 152~157
- Whipple CJ, Ciceri P, Padilla CM, Ambrose BA, Bandong SL, Schmidt RJ (2004). Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*. *Development*, 131 (24): 6083~6091
- Whipple CJ, Zanis MJ, Kellogg EA, Schmidt RJ (2007). Conservation of B class gene expression in the second whorl of a basal grass and outgroups links the origin of lodicules and petals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 1081~1086
- Whittall JB, Voelckel C, Kliebenstein DJ, Hodges SA (2006). Convergence, constraint and the role of gene expression during adaptive radiation: floral anthocyanins in *Aquilegia*. *Mol Ecol*, 15 (14): 4645~4657
- Winter KU, Becker A, Münster T, Kim JT, Saedler H, Theißen G (1999). MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7342~7347
- Winter KU, Weiser C, Kaufmann K, Bohne A, Kirchner C, Kanno A, Saedler H, Theißen G (2002). Evolution of class B floral homeotic proteins: obligate heterodimerization originated from homodimerization. *Mol Biol Evol*, 19: 587~596

- Wuest SE, O'Maoileidigh S, Rae L, Kwasniewska K, Raganelli A, Hanczaryk K, Wellmer F (2012). Molecular basis for the specification of floral organs by *APETALA3* and *PISTILLATA*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (33): 13452~13457
- Xiao H, Wang Y, Liu D, Wang W, Li X, Zhao X, Zhu L (2003). Functional analysis of the rice *AP3* homologue *OsMADS16* by RNA interference. *Plant Mol Biol*, 52 (5): 957~966
- Xu Y, Teo LL, Zhou J, Kumar PP, Yu H (2006). Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *Plant J*, 46 (1): 54~68
- Yamada K, Saraike T, Shitsukawa N, Hirabayashi C, Takumi S, Murai K (2009). Class D and B_{sister} MADS-box genes are associated with ectopic ovule formation in the pistil-like stamens of alloplasmic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 71 (1-2): 1~14
- Yang X, Wu F, Lin X, Du X, Chong K, Gramzow L, Schilling S, Becker A, Theißen G, Meng Z (2012). Live and let die - the B_{sister} MADS-box gene *OsMADS29* controls the degeneration of cells in maternal tissues during seed development of rice (*Oryza sativa*). *PLoS ONE*, 7 (12): e51435
- Yao J, Dong Y, Morris BA (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1306~1311
- Yao SG, Ohmori S, Kimizu M, Yoshida H (2008). Unequal genetic redundancy of rice *POSTILLATA* orthologs, *OsMADS2* and *OsMADS4*, in lodicule and stamen development. *Plant Cell Physiol*, 49 (5): 853~857
- Yu D, Kotilainen M, Pollanen E, Mehto M, Elomaa P, Helariutta Y, Albert VA, Teeri TH (1999). Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J*, 17: 51~62
- Zahn LM, Feng B, Ma H (2006). Beyond the ABC-model: regulation of floral homeotic genes. *Adv Bot Res*, 44: 163~207
- Zahn LM, Leebens-Mack J, Ma H, Theißen G (2005). To B or not to B a flower: the role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms. *J Hered*, 96 (3): 225~240
- Zhang S, Zhang JS, Zhao J, He C (2015). Distinct subfunctionalization and neofunctionalization of the B-class MADS-box genes in *Physalis floridana*. *Planta*, 241 (2): 387~402
- Zhang Y, Liu B, Yang S, An J, Chen C, Zhang X, Ren H (2014). A cucumber *DELLA* homolog *CsGAIP* may inhibit staminate development through transcriptional repression of B class floral homeotic genes. *PLoS ONE*, 9 (3): e91804
- Zheng BB, Wu XM, Ge XX, Deng XX, Grosser JW, Guo WW (2012). Comparative transcript profiling of a male sterile cybrid pumpkin and its fertile type revealed altered gene expression related to flower development. *PLoS ONE*, 7 (8): e43758