

辣椒花器官发育 MADS-box 基因的克隆与表达分析

郭爽^{1,2}, 马宁¹, 杨文才¹, 沈火林^{1,*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; ² 广州市农业科学研究院, 广州 510308)

摘要: 采用 RACE 技术从辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 花药中获得了一个控制辣椒花器官发育的 MADS-box 基因, 命名为 *PPI* (GenBank 登录号: GU812276)。该基因全长 952 bp, 编码 215 个氨基酸, 具有典型的 MADS 结构域和 K 结构域, 与番茄花器官发育 MADS-box 基因 *TPI* 高度同源, 同源性达 88%。系统进化树分析表明, *PPI* 基因属于花器官发育 B 类基因。RT-PCR 表达分析表明, 该基因在辣椒花瓣中的表达高于在花药、萼片以及子房等花器官中的表达, 在营养器官叶片中没有表达。

关键词: 辣椒; 花器官发育; MADS-box 基因; *PPI* 基因; RACE; RT-PCR

中图分类号: S 641.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 10-1591-07

Cloning and Expression Analysis of a Flowering-related MADS-box Gene in Pepper

GUO Shuang^{1,2}, MA Ning¹, YANG Wen-cai¹, and SHEN Huo-lin^{1,*}

(¹ College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² Guangzhou Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510308, China)

Abstract: A flowering-related MADS-box gene named *PPI* was cloned from pepper anthers (GenBank accession No. GU812276) using rapid amplification of cDNA ends. The full length cDNA of *PPI* was 952 bp with an open reading frame (ORF) encoding 215 amino acids. The deduced amino acids sequence contained a typical MADS domain and a K domain. Homology analysis showed that *PPI* had high homology to other MADS-box proteins from different species, especially 88% similarity to tomato *TPI*. Phylogenetic analysis indicated that *PPI* belonged to the MADS-box B subfamily. RT-PCR analysis showed that the expression of *PPI* gene was much stronger in petals than in anthers, sepals or ovaries, and no transcription was detected in leaves.

Key words: pepper; floral organ development; MADS-box gene; *PPI* gene; RACE; RT-PCR

参与调控高等植物花器官发育的 MADS-box 基因是近年来植物发育生物学研究的热点。MADS-box 是一个保守性很强的 DNA 结合结构域, 最早在酵母 *Mini Chromosome Maintenance 1* (*MCM1*) 基因 (Passmore et al., 1989)、拟南芥 *AGAMOUS* (*AG*) 基因 (Yanofsky et al., 1990)、

收稿日期: 2010-05-24; 修回日期: 2010-07-17

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7, 2008BADB1B04, 2009BADB8B01); 北京市教委共建项目; 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2009-2-06); 果类蔬菜产业技术体系北京市创新团队项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: SHL1606@cau.edu.cn)

金鱼草 *DEFICIENS* (*DEF*) 基因 (Sommer-Sommer et al., 1990) 和人类血清应答因子 *Serum Response Factor* (*SRF*) 基因 (Schwarz et al., 1990) 中发现, 因此取这 4 个基因的首字母缩写, 具有此结构的功能基因被命名为 MADS-box 基因。植物花器官发育过程中的大多数基因都属于 MADS-box 基因家族。前人根据对双子叶模式植物遗传突变体的研究, 提出了花发育的 ABCDE 模型, A、B、C、D、E 代表了 5 类功能不同的花器官特征基因, 单独或联合控制花器官的形态发育 (Theissen, 2001; Ferrario et al., 2004)。随着对拟南芥、矮牵牛、金鱼草等模式植物的研究, 克隆到很多 MADS-box 基因, 仅拟南芥中就有 100 多种 MADS-box 基因。

有关辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 花器官发育的 MADS-box 基因的研究报道较少。本研究中利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术对本实验室已经获得的辣椒恢复基因诱导的 EST 片段 TD16 (郭爽 等, 2009) 进行全长 cDNA 克隆, 获得了一个辣椒花器官发育 MADS-box 基因 *PPI* 的全长, 并利用 RT-PCR 技术检测了该基因在辣椒不同材料和不同器官上的表达特性, 旨在为进一步研究辣椒花器官发育相关基因的功能和机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 材料为细胞质雄性不育系 23A、121A 及其相应的近等基因恢复系 23C、121C, 其中 23A 和 23C 是甜椒类型, 121A 和 121C 是辣椒类型。

2009 年春季在中国农业大学上庄实验站大棚内常规种植。

在开花期, 取 23C 花瓣已开始变白的花蕾, 剥取其花药立即用液氮冷冻并在 -80°C 保存, 用于基因全长克隆; 剥取 23C、121C、23A 和 121A 的花药, 液氮冷冻, -80°C 保存, 用于不同材料的表达分析; 取 23C、121C 已开始变白的花蕾, 分别剥取其花瓣、萼片、子房和花药, 同时摘取嫩叶, 立即用液氮冷冻并在 -80°C 保存, 用于不同器官的表达分析。

1.2 总 RNA 的提取及基因的全长克隆

总 RNA 的提取依照 SV Total RNA Isolation System kit (美国 Promega 公司) 操作说明书进行。

基因全长克隆采用 RACE 技术, 按照 Smart Race cDNA Amplification Kit (美国 Clontech 公司) 试剂盒说明书进行。根据实验室已经获得的 EST 片段分别设计 3'端和 5'端特异引物 (ATTGTAGCCC TTCACTACGATGAGTG) 和 (CATAGCTTCCTCATGAATCCCTCTC) 进行 cDNA 末端快速扩增 (RACE)。

扩增产物采用北京鼎国生物技术有限责任公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收。插入 pGEM-T Easy 载体 (美国 Promega 公司), 热激法转化到 *E.coli* DH5 α 感受态细胞 (中国天根公司) 中, 在氨苄青霉素平板上进行阳性克隆筛选, 送上海生工生物工程服务有限公司测序。

测序结果在 NCBI 网站上 BLAST 比对, 用 DNAMAN 软件进行序列分析, MEGA4.1 软件构建系统进化树。

1.3 半定量 RT-PCR 检测基因的表达

设计基因序列特异引物用于检测 *PPI* 基因在辣椒不同材料和不同器官上的表达, 以辣椒 *Actin* 基因设计特异引物用作内标引物。

PCR 的扩增条件为: 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 54°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 25 个循环。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2 结果与分析

2.1 辣椒 *PPI* 基因的克隆与序列分析

BLAST 比对分析表明, 本实验室已经构建的辣椒恢复基因诱导的一段长度为 400 bp 的 EST 序列 TD16, 与花器官发育 MADS-box 基因序列有较高的同源性, 推测其为辣椒花器官发育 MADS-box 基因之一。进而设计特异引物序列进行 3' 和 5' RACE 扩增, 分别获得 703 bp 的 3' 端序列和 850 bp 的 5' 端序列。

利用 DNAMAN 软件去除两端载体序列和重叠部分, 将两段序列进行拼接, 得到了长度为 952 bp 的基因全长序列, 命名为 *PPI* (GenBank 登录号: GU812276)。经 Blast 比对, 该基因与番茄花器官发育 MADS-box 基因 *TPI* 高度同源, 同源性达 88%。

PPI 包含一个长度为 80 bp 的 5' 非翻译区和 227 bp 的 3' 非翻译区, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码一个含 215 个氨基酸的蛋白质, 推定的分子量为 25.1 kD, 推测的等电点为 9.0。蛋白结构域分析表明 *PPI* 蛋白含有典型的 MADS 结构域 (MADS-MEF2-like) 和 K 结构域 (K-box) 两个保守结构域 (图 1), 由此推测, *PPI* 基因应属于 MADS-box 基因家族 II 型基因。

```

1  ATGGGATTCAATACAACACTACTTATTTCAATTTCAAGAAGAAGAAAGAGTTAGAGATT
61  ATCACGTAGCTTTTTTAGGTATGGGGAGAGGGAAAAATAGAGATAAAGAGAATAGAAAACT
    M G R G K I E I K R I E N S
121 CAAAACAACAGGCAAGTGACATCTCAAAGAGAAGAAATGGGATCATCAAAGAAAGCTAGAG
    N N R Q V T Y S K R R N G I I K K A R E
181 AAATCACTGTCTTTTGTGATGCCAAAAGTCTCCCTTATCATCTTTGGTACTTCTGGCAAAG
    I T V L C D A K V S L I I F G T S G K M
241 TGCATGAATATTGTAGCCCTTCTACTACGATGAGTGATATACTAGATGGTTACCAAAAAAG
    H E Y C S P S T T M S D I L D G Y Q K A
301 CTTCTGGGAGGAGGCTATGGGATGCTAAGCATGAGAATTTGAGCAATGAAATTGATAGAA
    S G R R L W D A K H E N L S N E I D R I
361 TCAAGAAAGAGAATGACAGTATGCAGGTTAAGCTCAGGCACCTTAAAGGAGAAGATATCA
    K K E N D S M Q V K L R H L K G E D I N
421 ATTCACTGAACCAACAAAAGAGCTTATGGTTATGGAAGAAGCATTAGAAAAATGGGCTTTCTA
    S L N H K E L M V M E E A L E N G L S S
481 GTATCAGTGCCAAAGCAGTCTGAGATCTTGAGGATGGTCAGGAAAAATGATCAAAATTCTGG
    I S A K Q S E I L R M V R K N D Q I L E
541 AGGAGGAACATAAGCAACTTCAATATGCTTTGCACCAAAAGGAGATGGCAGCCATGGGTG
    E E H K Q L Q Y A L H Q K E M A A M G G
601 GAAATATGAGAGGGATTATGAGGAAAGCTATGTACCATCAAAGAGAAAGGGAGGATTACG
    N M R G I H E E A M Y H Q R E R E D Y E
661 AGTACCAGCAGATGCCATTTGCTCTACGAGTTCAGCCGATGCAGCCAAATCTACATGAAA
    Y Q Q M P F A L R V Q P M Q P N L H E R
721 GAATGTAGCTGCATTATTAATTAATTCCAGTTTAAATTTGAATGATCTGTAGTAACATTG
    M *
781 GGTTCCTACTAGTATTAGAAAATTAAGACTATTTAACGCTAGTTATAATAGATATAATAT
841 ATGATGAACTAGCAAAAGACTTTGTTGCAAGGAAACTTTGATTGTCCAAATACTTATTACC
901 TAATACATAGATGGAGTACTGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

图 1 *PPI* 基因核苷酸序列及其推导出的氨基酸序列

方框中 ATG 为起始密码子; 方框中 TAG 为终止密码子; 实线区为 MADS-MEF2-like 结构域; 虚线区为 K-box 结构域。

Fig. 1 The full cDNA nucleotide acid sequence and deduced amino sequence of *PPI* gene

ATG: Start codon; TAG: Stop codon; MADS-MEF2-like domain underlined with solid line;

K-box domain with dashed line.

2.2 *PPI* 氨基酸序列同源性比较与系统进化树分析

经氨基酸序列同源检索, *PPI* 氨基酸序列与同科植物矮牵牛 *PMADS2* (Q07474) 和 *FBP3* (CAA50549)、番茄 *TPI* (ABG73411) 的氨基酸序列的同源性最高, 分别达 91%、91%和 88%。

图 2 是 *PPI* 基因推定的氨基酸序列与一致性靠前的 5 个不同物种的 MADS-box 基因的氨基酸序列的比对分析结果, 可以看出氨基酸序列的 5'端的保守性较高, 而 3'端的保守性较低, 这是 MADS-box 基因的典型特征。

辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLIIFGTS GKMHEYCSPS	60
矮牵牛 <i>Petunia</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLIIFGTS GKMHEYCSPS	60
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLIIFASSGKMHEYCSPS	60
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLVIFASSGKMHEYCSPS	60
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLIIFASSGKMHEYCSPS	60
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	MGRGKIEIKRIENSSNRQVTYSKRRNGI IKKAKEITVLCDAKVSLVIFASSGKMHEYCSPS	60
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	TTTSDILDGYQKASGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
矮牵牛 <i>Petunia</i>	TTLPDMLDGYQKTSGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	TTISDMLDGYQKASGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	TTLIDILDGYQKASGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	TKLIDILDGYQKTSGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	TPLVDILDGYQKASGRRLWDAKHENLSNEIDRIKKENDSMQVKLRHLKGEDINSLNHKEL	120
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	MMEEALENGLSSISAKQSEILRMVRKNDQILEEEHKQLQYALHOKEMAMGG..NMRGI	178
矮牵牛 <i>Petunia</i>	MMLEEGLNGLSSISAKQSEILRMVRKNDQILEEEHKQLQYALHOKEMAMGG..NMR..	176
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	IIMEEALQNGLSSISAKQSEILRMVRKNDQILEEENKQLQYALHOKEMGAIGSGNMRG.	179
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MAIEDALEITGLASVRNKQMEFYKMKVKNQRIILEEENKHLNYIVHHQGMPEAG..NVR..	176
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	MALEDALENGLTQVRAKQNDVLDMAKKNTKFLLEDNKQLNFIVNQQLTYEMV..REH..	176
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	MALEEALENGLTGVRKQSEFMKMMRTNERMMEEENKRLNYELVQKEMVAMGD..SVR..	176
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	HEEAMTHQREEREDYEYQMPFALRV.QPMQPNLHERM.	214
矮牵牛 <i>Petunia</i>	MIEEVYHQDR.DYEYQMPFALRV.QPMQPNLHERM.	211
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	IHEEVYHQREER.DYEY.QMPFGLRVHQPMPNLHERM.	214
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	EVEGYHQRAVRDYMP.QMPFAFRV.QPIQPNLQERI.	211
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	MDYHGYHRAARADFNS.QMPFAFRV.QPMQPNLQERM.	212
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	EMDIGYNQRM.DFNS.QMPFAFRV.QPIQPNLQERE.	210

图 2 *PPI* 基因推定的氨基酸序列与其他物种 MADS-box 基因氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino-acid sequences of *PPI* with other MADS-box genes

在拟南芥中与花发育相关的 MADS-box 基因分为 5 个亚族——AP1、AP3/PI、AG、AGL2 和孤儿亚族 (Theissen et al., 2000)。

以这 5 个亚族作为对照, 选取其中一些典型基因对 *PPI* 基因进行系统进化树分析, 结果 (图 3) 表明 *PPI* 基因与拟南芥 *PI* (NP-197524) 基因聚为一类, 属于 MADS-box 基因家族中的 AP3/PI 亚族成员, 为植物花器官发育 B 类功能基因。

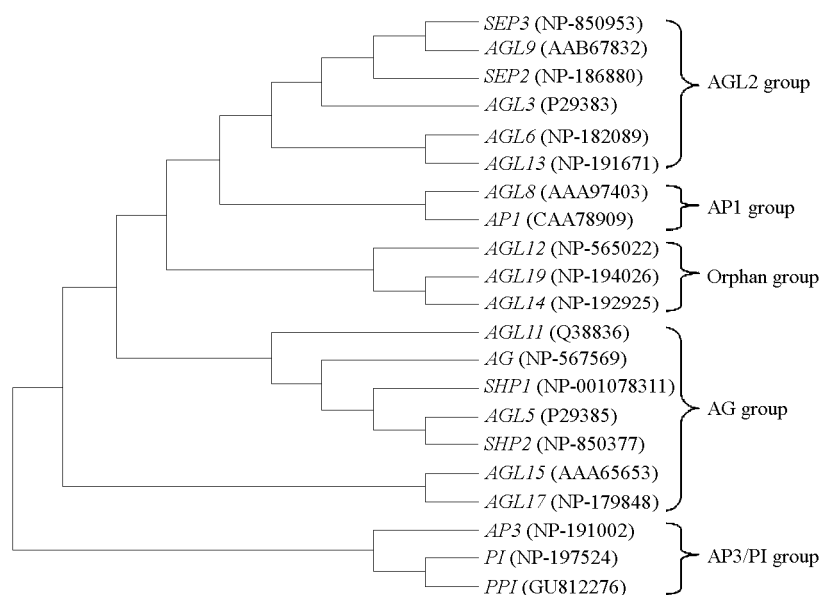
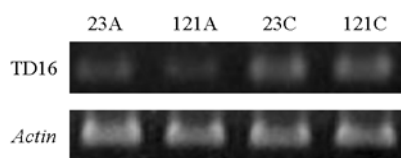


图 3 MADS-box 基因编码蛋白的系统进化树分析

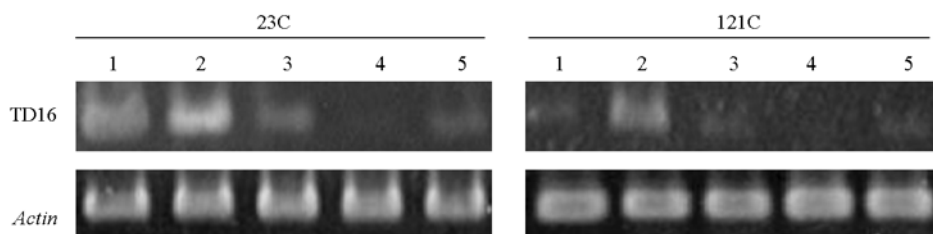
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of proteins encoded by MADS-box genes

2.3 *PPI* 在辣椒不同材料和器官上的表达分析

用半定量 RT-PCR 技术检测 *PPI* 基因在辣椒不育系和恢复系花药上的表达量。结果表明, *PPI* 在不育系材料 23A 和 121A 之间或者恢复系材料 23C 和 121C 之间的表达量基本相同, 但是两份不育系材料中的表达量均明显低于两份恢复系材料 (图 4)。

图 4 *PPI* 在辣椒不同材料花药中的表达Fig. 4 Expression of *PPI* in different materials of pepper in anther

在恢复系材料中, *PPI* 基因在花瓣中的表达量明显高于在花药上的表达; 在花药、萼片、子房等花器官上的表达水平相似; 在营养器官叶片上不表达; 两份恢复系材料各器官上的表达量基本相同 (图 5)。

图 5 *PPI* 在辣椒恢复系材料 23C 和 121C 不同器官上的表达

1: 花药; 2: 花瓣; 3: 萼片; 4: 叶片; 5: 子房。

Fig. 5 Expression of *PPI* in different tissues in pepper restoration lines 23C and 121C

1: Anther; 2: Petal; 3: Sepal; 4: Leaf; 5: Ovary.

3 讨论

辣椒为两性花,但雄蕊的不正常发育,会产生不正常的花药或者花粉,以致发生雄性不育。有关花发育的分子机理是基于金鱼草、拟南芥和矮牵牛等模式植物的研究而阐述的,但均未涉及雄性不育的本质。MADS-box 基因家族在调节控制植物花器官发育过程中起着重要作用(Theissen, 2001; Ferrario et al., 2004)。本试验通过 RACE 技术克隆了辣椒花器官发育相关的一个 MADS-box 基因 *PPI*。氨基酸序列比对、蛋白结构域分析和系统进化树分析结果均表明, *PPI* 基因属于 MADS-box 基因家族中的 AP3/PI 亚家族成员,为 ABCDE 花发育模型理论中的 B 功能基因。在花发育的 ABCDE 模型理论中, B 类基因控制双子叶植物花瓣和雄蕊的发育(Mouradov et al., 1999),属于 MADS-box 基因家族,编码转录因子,其功能丧失会使花瓣转变为萼片,雄蕊转变为心皮(Pelaz et al., 2001)。拟南芥等植物中花瓣和雄蕊的 B 类控制基因是 *APETALA3* (*AP3*) 和 *PISTILLATA* (*PI*) (Jack et al., 1992; Goto & Meyerowitz, 1994)。在拟南芥中, *PI* 和 *AP3* 基因编码的蛋白质形成异源二聚体,共同控制花瓣和雄蕊的发育。到目前为止,已经从拟南芥(Lawton-Rauth et al., 1999)、番茄(Martino et al., 2006)、姜(Gao et al., 2006)、番红花(Kalivas et al., 2007)、月季(Mondragon-Palomino, et al., 2009)、番木瓜(Ackerman et al., 2008)等多种植物中克隆到了花器官发育 B 类基因。

PPI 蛋白含有典型的 MADS 结构域(MADS-MEF2-like)和 K 结构域(K-box),这两个保守结构域是 MADS-box 基因家族的典型特征。MADS 结构域是存在于所有 MADS-box 基因 5'端的一个高度保守区域,具有编码 DNA 结合、核定位及聚合反应的功能(Riechmann et al., 1996; Riechmann & Meyerowitz, 1997; Immink et al., 2002)。蛋白质的 MADS 结构域越相似,所结合的 DNA 的序列组成也越一致(Davies et al., 1996)。K 结构域是一中度保守的序列,是转录因子的结构特征序列,能够作为二聚体基元,形成卷曲螺旋结构,调节蛋白质与蛋白质之间的相互聚合反应(Fan et al., 1997; Yang et al., 2003)。

调控花器官发育的 MADS-box 基因在不同物种中行使功能的时空模式呈现多样化特征。已有研究表明,花器官发育 B 类基因主要在花瓣和雄蕊上表达,在花发育早期的雌蕊中也有表达。在拟南芥中, *PI* 基因在花瓣和雄蕊整个发育过程中均表达,但是在非花组织中不表达(Mouradov et al., 1999)。而在玉米中 *PI* 基因在种子、叶片和根中均有表达。在甘蓝型油菜中, *PI* 基因在花瓣和雄蕊中表达水平相似。由此可见,不同植物中 *PI* 基因的表达模式有一定差异。本试验研究结果表明,在辣椒中, *PPI* 基因在花瓣中的表达量要强于在花药、萼片以及子房等花器官中的表达量,在花药、萼片和子房中的表达量相似,而在营养器官叶片中不表达。同时,在对辣椒不同材料的表达分析中, *PPI* 基因在不育株花药中的表达量明显低于在可育株花药中的表达量。这一结果表明 *PPI* 基因与花药发育紧密关联。但其在控制花药发育,或者说在控制雄蕊发育过程中行使什么样的功能,还有待进一步研究。

作者通过 RACE 技术克隆了控制辣椒花器官发育的 B 类基因 *PPI*,并对其空间表达模式进行了初步分析。但有关其更全面的时空表达模式和基因功能,还有待于利用 Northern 杂交、转基因和基因敲除等技术进行深入研究,并最终为阐明辣椒花器官发育的分子调控机理奠定基础。

References

- Ackerman C M, Yu Q Y, Kim S T, Paull R E, Moore P H, Ming R. 2008. B-class MADS-box genes in trioecious papaya: Two *paleoAP3* paralogs, *CpTM6-1* and *CpTM6-2*, and a *PI* ortholog *CpPI*. *Planta*, 227: 741 - 753.
- Davies B, Egea-Cortines M, Silva E, Saedler H. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic and MADS-box proteins. *EMBO J*, 15: 4330 - 4334.

- Fan H Y, Hu Y, Tudor M, Ma H. 1997. Specific interactions between K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J*, 12: 999 – 1010.
- Ferrario S, Immink R G, Angenent G C. 2004. Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 84 – 91.
- Gao X M, Xia Y M, Li Q J. 2006. Isolation of two putative homologues of *PISTILLATA* and *AGAMOUS* from *Alpinia oblongifolia* (Zingiberaceae) and characterization of their expression. *Plant Science*, 170: 674 – 684.
- Goto K, Meyerowitz E M. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes and Development*, 8: 1548 – 1560.
- Guo Shuang, Shen Huo-lin, Yang Wen-cai, Yang Juan, Wang Wen. 2009. Isolation of fertility restoration-related ESTs in pepper cytoplasmic male sterility lines using SSH. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (10): 1443 – 1449. (in Chinese)
- 郭 爽,沈火林,杨文才,杨 娟,王 雯. 2009. 利用抑制消减杂交技术分离辣椒细胞质雄性不育育性恢复相关 EST. *园艺学报*, 36 (10): 1443 – 1449.
- Immink R G, Gadella T W, Ferrario S, Busscher M, Angenent G C. 2002. Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad*, 99: 2416 – 2421.
- Jack T, Brockman L L, Meyerowitz E M. 1992. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS-box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68: 683 – 697.
- Kalivas A, Pasentsis K, Polidoros A N, Tsaftaris A S. 2007. Heterotopic expression of B-class floral homeotic genes *PISTILLATA/GLOBOSA* supports a modified model for crocus (*Crocus sativus* L.) flower formation. *DNA Sequence*, 18: 2, 120 – 130.
- Lawton-Rauh A L, Buckler E S, Purugganan M D. 1999. Patterns of molecular evolution among paralogous floral homeotic genes. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1037 – 1045.
- Martino G D, Pan I, Emmanuel E, Levy A, Irish V F. 2006. Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell*, 18: 1833 – 1845.
- Mondragon-Palomino M, Hiese L, Harte A, Koch M A, Theissen G. 2009. Positive selection and ancient duplications in the evolution of class B floral homeotic genes of orchids and grasses. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 81 – 116.
- Mouradov A, Hamdorf B, Teasdale R D, Kim J T, Winter K U, 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. *Developmental Genetics*, 25: 245 – 252.
- Passmore S, Elble R, Tye B K. 1989. A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev*, 3: 921 – 935.
- Pelaz S, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla E R, Yanofsky M F. 2001. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 11: 182 – 184.
- Riechmann J L, Meyerowitz E M. 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem*, 378: 1097 – 1101.
- Riechmann J L, Wang M, Meyerowitz E M. 1996. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS homeotic protein APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res*, 24: 3134 – 3141.
- Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H. 1990. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250: 931 – 936.
- Sommer H, Beltran J P, Huijser P, Pape H, Lonning W E, 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: 605 – 613.
- Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 75 – 85.
- Theissen G, Becker A, Ri-Rosa A, Kanno A, Kim J T, Munster T, Winter K U, Saedler H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 42 (1): 115 – 149.
- Yang Y Z, Fanning L, Jack T. 2003. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *The Plant Journal*, 33: 47 – 59.
- Yanofsky M, Ma H, Bowman G, Drews K, Feldmann K, Meyerowitz E. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcriptional factors. *Nature*, 346: 35 – 39.