

簸箕柳 AP3 同源基因 SsMADS 的克隆与特性分析

陈英, 关亚丽, 程强, 曹友志, 黄敏仁*

南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 南京 210037

摘要: 用 cDNA 末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)方法从簸箕柳雄花序中克隆了一个 AP3 同源基因的 cDNA, 长 826 bp, 包括完整的编码区、5'-UTR 和 3'-UTR, 并将其相应的基因命名为 SsMADS。该基因由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 编码区长 723 bp, 编码 241 个氨基酸, 其 N-端具有典型的 MADS 保守结构域。序列分析表明, SsMADS 编码的氨基酸序列与毛果杨(*Populus trichocarp*) AP3 同源蛋白有 95.7% 相似性, 与其他几种柳属植物的 AP3 同源蛋白相似性达 96.1%~99.6%。实时定量 RT-PCR 表明, SsMADS 在叶、茎和根中表达量极低, 在花序中表达量较高, 并且其表达量在花器官的早中期发育阶段逐步提高, 说明该基因在簸箕柳花器官的发育中起作用。

关键词: 簸箕柳; SsMADS; AP3; 实时定量 RT-PCR; 系统进化树分析

Cloning and Character Analysis of *Salix suchowensis* AP3 Homologue Gene SsMADS

CHEN Ying, GUAN Ya-Li, CHENG Qiang, CAO You-Zhi, HUANG Min-Ren*

Key Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: A new AP3 homologue gene cDNA, named SsMADS was cloned by RACE method from male inflorescence of *Salix suchowensis*, it has 7 exons and 6 introns. The full length cDNA of SsMADS is 826 bp long, including the whole coding region and 5'-UTR and 3'-UTR. The coding region of 732 bp codes for a polypeptide of 241 amino acids, containing a typical MADS-conserved domain in N-ends. Its amino acid sequence shows 95.7% identity to that of *Populus trichocarp* AP3 homologue gene PTD, and 96.1%~99.6% identity to the proteins of *Salix* AP3 homologue genes. Its expression quantity is very low in leaf, shoot and root, but very high in inflorescence as demonstrated by real-time quantitative RT-PCR analysis, and the quantity increases at the early and middle development stages of floral organs but decreases at the late stage. The above results indicate that SsMADS plays a very important role in the floral organ development of *Salix suchowensis*.

Key words: *Salix suchowensis*; SsMADS; AP3; real-time quantitative RT-PCR; phylogenetic tree analysis

开花是高等植物个体发育过程的中心环节。植物的花发育是环境信号与植物内在的遗传机制共同作用的结果。有人认为, 许多基因的相互作用构成一个复杂的网络调控系统, 共同调控植物的花发育过程(Levy 和 Dean 1998)。在花发育的遗传网络中, 花器官特征基因(floral organ identity gene)决定花器官, 即花器官原基发育成萼片、花瓣、雄蕊和心皮。当内外条件达到协调时, 开花基因就会启动花分生组织特征基因, 使植物从营养生长转变到生殖生长; 接着, 花器官特征基因开始表达, 并激活其下游基因, 从而形成不同的花器官。

花发育的 ABC/ABCDE/四聚体模型显示, 花器官特征基因决定花器官的机制(Coen 和 Meyerowitz

1991; Theissen 2001; Jack 2004)。植物花器官发育 B 类基因包括 APETALA3 (AP3)/DEFICIENS (DEF) 和 PISTILLATA (PI)/GLOBOSA (GLO), 控制双子叶植物花瓣和雄蕊的发育, 它们属于 MADS-box 基因家族, 编码转录因子, 这些基因的突变能导致花瓣转变为萼片, 雄蕊转变为心皮(Krizek 和 Meyerowitz 1996)。近年来有关植物花发育 B 类基因的基因克隆、基因表达和转基因研究取得了重要的进展, 但多限于一些草本模式植物, 在木本植物中的研究很少。

收稿 2007-04-06 修定 2007-05-14

资助 国家自然科学基金(30471406)。

* 通讯作者(E-mail: mrhuang@njfu.com.cn; Tel: 025-85427412)。

由于杨树全基因组序列的公布(Tuskan 等 2006), 杨树成为木本植物研究领域的模式物种。但杨树一般需 6~8 年才能开花, 研究其花发育难度很大。而与其同属杨柳科(Salicaceae)的柳属(*Salix*)植物中, 灌木柳(如簸箕柳)无论是实生苗还是扦插苗一年即可开花, 是研究木本植物开花机制不可多得理想材料。柳树每一花序含有许多独立的花原基, 继而发育为单性花, 雌雄异株。通常大部分开单性花的植物在花器官形成早期, 均具有两性组织, 但在花发育的过程中其中一种性器官发育停止, 从而形成单性花。而柳树在花原基起始阶段就是真正意义上的单性花。因此, 柳树花器官仅含两轮, 高度缩小的花被包被雄蕊或心皮。

本文从簸箕柳雄株花序中分离和克隆了柳树 *AP3* 同源基因, 并对该基因的表达特征作了分析, 从理论上对林木花器官形成发育机制研究作了补充, 还为建立适用于林木花器官发育生物学研究的模式植物系统作了初步探索。

材料与amp;方法

植物材料为簸箕柳(*Salix suchowensis*), 取自本校杨树育种圃, 春季取雄株幼叶用于提取基因组 DNA。春季枝条萌发出根、叶和花序时, 分别取样。根据出现花序后时间点, 分别取不同发育时期的花序, 液氮速冻, -70℃ 下保存备用。

RNA 分离用 RNeasy plant mini kit (Quagene), 分别从不同发育时期的花序、叶、幼茎和根等器官提取 RNA。按 Murray 和 Thompson (1980) 的方法用 CTAB 法提取总 DNA。

根据毛果杨 *AP3* 同源基因(*PTD*)的核酸序列, 设计合成了 5' 端引物 P1 (5'-TTG GAT CCA TGG GTC GTG GAA AGA-3')和 3' 端引物 P2 (5'-AAG AGC TCT CAA GGA AGG CGA AGT T-3'), 以簸箕柳基因组 DNA 为模板, 用以上引物进行 PCR 扩增。20 μL PCR 反应混合物含有: 2 μL 的 10×PCR 缓冲液, 2 μL 的 dNTP (2 mmol·L⁻¹), 1.2 μL 的 MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹), 10 pmol 5' 端引物, 10 pmol 3' 端引物, 2 μL 簸箕柳基因组 DNA, 1 U *Taq* 酶 (TaKaRa), 32 个循环 PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳分离。切胶回收(优晶生物), 连接于 pMD19T-

simple (宝生物)载体上, 测序(Invitrogen)。

SsMADS 全长 cDNA 的克隆用花序总 RNA 为材料, 使用 RT-PCR 第一链合成系统(first-strand synthesis system for RT-PCR, invitrogen)进行寡聚脱氧胸腺嘧啶 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 反转录 cDNA 第一链。根据 *SsMADS* 的基因组预测外显子序列合成特异引物 5' *SsMADS* outer (GTC TCG GAG ATG GAT ATG GC)、5' *SsMADS* inner (CTT CTT CCT GCA GGT GTC GTT)、3' *SsMADS* outer (ATC TCA ATC TTT CCA CGA CCC)和 3' *SsMADS* inner (CCG CCA ACC TCT TTG CAT TCC), 采用基于 RNA 连接酶的 cDNA 末端快速扩增法试剂盒(RLM-RACE kit, Ambion)进行 *SsMADS* cDNA 的 5' 和 3' 端序列快速扩增, 并进行序列拼接。再根据拼接结果设计扩增 *SsMADS* cDNA 全长的引物: full-length-F (TAGCTAGCGCTACAGCTTTCACAA); full-length-R (CCCAGGCGCCTCTTAGATTATTAA)。扩增产物切胶回收、连接、测序。

SsMADS 的表达分析时, 根据 *SsMADS* 的 cDNA 序列合成特异引物 P3 (5'-CCG CCA ACC TCT TTG CAT TCC-3')和 P4 (5'-GCC ATA TCC ATC TCC GAG ACA A-3'), 以簸箕柳泛素类似物基因(ubiquitin-like, *UBQ-L*)做对照, 用不同发育时期的花序、嫩茎、根和叶的总 RNA, 在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪上进行 RT-PCR。20 μL 的 PCR 反应混合物含 3 mL 第 1 链 cDNA, 10 μL 的 2×绿色荧光染料 PCR 反应混合物(SYBR Green PCR Master Mix), P3 引物 10 pmol, P4 引物 10 pmol, 去离子水 4.6 μL。PCR 反应条件为 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 后 40 个循环为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 同时每对引物设无模板对照(NTC), 每个反应扩增效率采用 Ramakers 等(2003)提出的方法计算(LinRegPCR 软件)。

根据 *SsMADS* 序列, 设计引物, 以垂柳(*S. babylonica* L.)、黄花柳(*S. caprea* L.)、黄枝白柳(*S. alba* var. *vitellina*)、杞柳(*S. integra* Thunb.)、绵毛柳(*S. erioclada*)基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 测序。根据获得的簸箕柳 cDNA 全长序列及其剪切规律, 以及得到的垂柳、黄花柳、黄枝白柳、杞柳、绵毛柳等的 DNA 序列, 预测得到了 5 种柳树的全长 cDNA 序列, 然后用

softberry 软件预测各个 cDNA 编码的氨基酸。使用 EMBL-EBI 中的 Align 程序, 对柳属植物 *AP3* 同源基因进行 cDNA 和氨基酸同源序列比对分析。

运用 DNAMAN 软件对簸箕柳 *AP3* 同源基因 *SsMADS* 编码的氨基酸序列与其他植物 *AP3* 同源基因的氨基酸序列作同源性比较。系统进化树分析 (phylogenetic tree analysis) 采用 Phylip 3.64 软件包, 邻位相连法 (neighbor-joining), 并进行 1 000 次抽样置换检测。

实验结果

1 柳树 *AP3* 同源基因 *SsMADS* 基因的分离和克隆

根据毛果杨 *AP3* 同源基因 (*PTD*) 的核酸序列设计引物, 以簸箕柳雄株基因组总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得了与预期产物大小相一致的片段, 测序分析, *SsMADS* 基因组序列全长为 2 133 bp。

根据 *SsMADS* 基因序列设计 RACE 引物, 使用 RLM-RACE 方法对簸箕柳 *AP3* 同源基因进行 5' 和 3' 端扩增, 实验结果显示 5' 和 3' RACE 均能扩增出特异性条带 (图 1)。

将特异性条带切胶回收纯化, 克隆到 T 载体上, 测序, 序列拼接后获得簸箕柳 *AP3* 同源基因的全长 cDNA 序列。并采用 *SsMADS* cDNA 全长

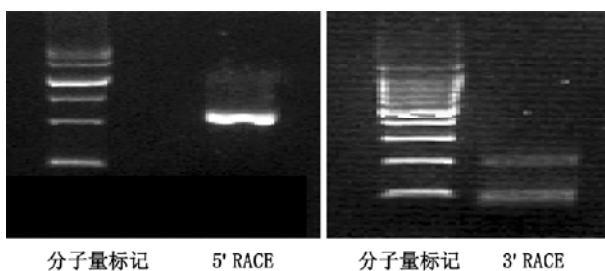


图 1 5'RACE 和 3'RACE 扩增图谱

Fig.1 The results of 5'RACE and 3'RACE

引物扩增得到其全长 cDNA 序列, 长 826 bp, 编码 241 个氨基酸, 预测分子量大小为 28 kDa。将 *SsMADS* 基因组序列与 cDNA 序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/> 进行分析比较, 结果 (图 2) 表明, 该基因包含 7 个外显子和 6 个内含子。

通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rps> 蛋白结构域预测工具, 发现 *SsMADS* 在 N 末端具有 MADS-box 和 K-box 保守结构域 (图 3)。进一步分析表明, 簸箕柳 *AP3* 同源基因编码的氨基酸序列同毛果杨 *AP3* 蛋白具有 95.7% 相似性, 可见该基因在杨属植物和柳属植物之间具有极高的保守性。

2 *SsMADS* 的表达分析

采用 *UBQ-L* 基因作为内对照基因, 进行实时定量 RT-PCR 分析, 研究 *SsMADS* 基因主要在簸箕柳不同发育阶段的花器官以及在根、茎、叶中表达模式。结果 (图 4) 表明, *SsMADS* 基因不同组织的相对表达量有明显差别, 在花器官中的表达量随着花器官的发育而提高, 在 2~3 cm 花序期时达到最大, 其相对表达量是 0.5~1 cm 花序期的 2 倍多 (2.27:1.00)。而到了 >3 cm 花序期, *SsMADS* 基因的相对表达量又有所下降 (1.29)。说明随着花器官的成熟, 该基因的表达量会有所下降。在叶、茎和根中, *SsMADS* 基因的相对表达量非常低, 均不到 0.01。花器官发育早期 (0.5~1 cm 花序期) 中的表达量是其 100 多倍, 在花器官中表达量最大时可以达到其 200 多倍 (2.27:0.01)。该结果表明 *SsMADS* 基因在花器官中是特异表达的, 对于花器官的形成具有重要作用。

3 柳属植物 *AP3* 同源基因全长 cDNA 克隆与分析

根据获得的簸箕柳 cDNA 全长序列及其剪切规律, 以及测序得到的垂柳、黄花柳、黄枝白

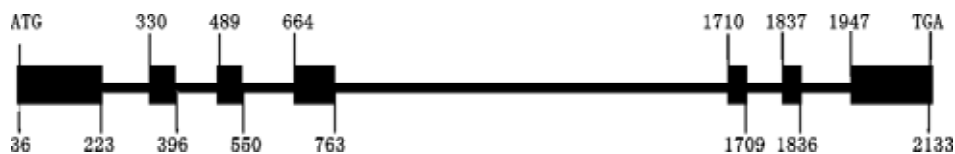


图 2 *SsMADS* 基因结构

Fig.2 The frame of *SsMADS*

图中方块表示外显子、粗线条表示内含子, 数字的单位是 bp。

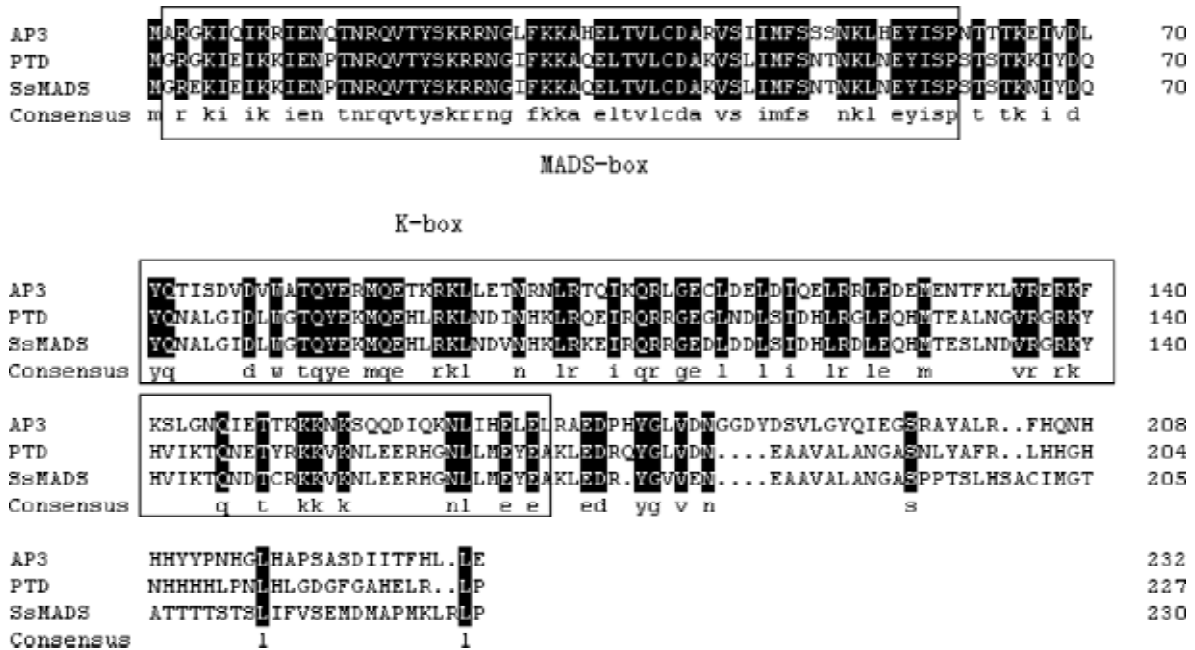


图3 SsMADS 结构分析

Fig.3 The analysis of structure of SsMADS

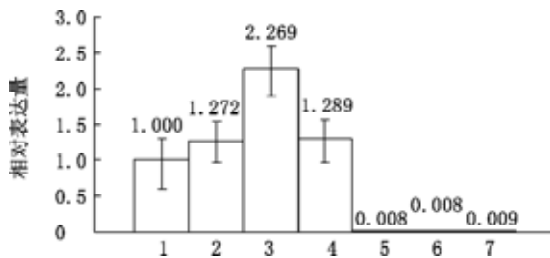


图4 实时定量 RT-PCR 技术对簸箕柳 SsMADS 的表达分析

Fig.4 Expression analysis of SsMADS by real-time RT-PCR

1: 0.5~1 cm 大小的花序; 2: 1~2 cm 大小的花序; 3: 2~3 cm 大小的花序; 4: >3 cm 大小的花序; 5: 叶; 6: 茎; 7: 根。

柳、杞柳、绵毛柳等的 DNA 序列, 预测得到了 5 种柳树的全长 cDNA 序列, 分别用 *SbMADS*、*ScMADS*、*SaMADS*、*SiMADS* 和 *SeMADS* 表示, 然后使用 Softberry 软件预测各个 cDNA 编码的氨基酸。

使用 EMBL-EBI 中的 Align 程序, 对柳属植物 AP3 同源基因进行 cDNA 和氨基酸同源序列比对分析, 结果表明, 柳属不同物种中的 AP3 同源基因在核苷酸水平和氨基酸水平均有很高的相似性, 其中核苷酸水平的相似性为 95% (黄枝白柳和黄花

柳之间)~98.7% (簸箕柳和杞柳之间) (表 1), 氨基酸水平的相似性为 95.2% (黄枝白柳和绒毛柳之间)~99.6% (簸箕柳和杞柳之间) (表 2)。

4 系统进化树分析

用 DNAMAN 软件比较簸箕柳 AP3 同源基因 *SsMADS* 编码的氨基酸序列与其他植物 AP3 同源基因的氨基酸序列作同源性的结果表明, 簸箕柳与毛果杨 (*Populus trichocarpa*, AF057708) AP3 同源基因编码的氨基酸序列有 95.7% 同源性, 而与苹果 (*Malus domestica*, AJ251116)、玫瑰 (*Rosa rugosa*, AB055966)、百合 (*Lilium regale*, AF503913)、矮牵牛 (*Petunia hybrida*, AF230704)、大丁草 (*Gerbera hybrida*, AJ009724)、郁金香 (*Tulipa gesneriana*, AB094966)、萱草 (*Hemerocallis hybrid*, AF209729) 和向日葵 (*Helianthus annuus*, AY173070) 的同源性则分别为 50.4%、49.2%、46.8%、76.1%、51%、43.2%、47.4% 和 45%。

采用 Clustal X 软件比较分析分别来自簸箕柳、毛果杨、苹果、玫瑰、大丁草、矮牵牛、百合、郁金香、拟南芥、向日葵和萱草的 AP3 同源基因的氨基酸序列的结果表明, 来自不同植物的 AP3 同源基因其编码的氨基酸序列在近 5' 端

表1 柳属植物 AP3 同源基因 cDNA 序列的相似性比较

Table 1 Comparison on similarity of cDNA sequences in homologous AP3 gene from *Salix*

基因	<i>SbMADS</i>	<i>ScMADS</i>	<i>SaMADS</i>	<i>SsMADS</i>	<i>SiMADS</i>	<i>SeMADS</i>
<i>SbMADS</i>	***	95.6	98.2	97.4	97.5	96.4
<i>ScMADS</i>	-	***	95.0	97.1	96.9	97.1
<i>SaMADS</i>	-	-	***	96.5	96.7	95.3
<i>SsMADS</i>	-	-	-	***	98.7	98.0
<i>SiMADS</i>	-	-	-	-	***	97.7
<i>SeMADS</i>	-	-	-	-	-	***

表中数字为核苷酸相似百分比。

表2 柳属植物 AP3 同源基因氨基酸序列的相似性比较

Table 2 Comparison on similarity of amino acids sequences in homologous AP3 gene from *Salix*

基因	<i>SbMADS</i>	<i>ScMADS</i>	<i>SaMADS</i>	<i>SsMADS</i>	<i>SiMADS</i>	<i>SeMADS</i>
<i>SbMADS</i>	***	96.1	97.4	97.0	97.4	95.7
<i>ScMADS</i>	-	***	95.3	97.8	97.8	97.8
<i>SaMADS</i>	-	-	***	96.1	96.5	95.2
<i>SsMADS</i>	-	-	-	***	99.6	98.3
<i>SiMADS</i>	-	-	-	-	***	98.3
<i>SeMADS</i>	-	-	-	-	-	***

表中数字为氨基酸相似百分比。

有较高的同源性, 而该区域属于高等植物非常保守的 MADS-box 基序(motif), 是转录因子的一个重要特征。因此, 推测本研究获得的簸箕柳 AP3 同源基因可能具有转录因子的功能。

图5为采用Phylip 3.64软件包构建的以上几种植物 AP3 同源基因系统进化树。来自菊科的大丁草和向日葵聚成一类, 蔷薇科的玫瑰和苹果聚成一类, 百合科的郁金香和百合聚成一类, 簸箕柳等6种柳树与杨属的毛果杨聚成一类。结果表明, 以 AP3 同源基因序列为基础构建的进化树, 与传统的植物学分类基本吻合。因此认为, 基于同源序列比对所构建的系统进化树能够比较准确地反映物种之间的亲缘关系。

讨 论

AP3/DEF 和 PI/GLO 基因编码的蛋白质形成异二聚体, 为多种植物花瓣和雄蕊发育所必需。AP3 基因表达的调节分两步: AP3 最初表达是由花分生组织基因(API、LFY、UFO)诱导的。AP3 的表达起始后, 这些基因编码蛋白质可以自动调节维持其自身基因在花瓣和雄蕊中的表达。AP3

启动子能够由 AP3 类固醇诱导形式激活, 这种激活可能是由 AP3 启动子中的 2 个 CArGbox 调节的 (Honma 和 Goto 2000, 2001)。AP3 可直接调节 NAP (NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI) 基因, NAP 在花发育后期表达, 在发育中的花瓣和雄蕊中表达, 其表达与花瓣和雄蕊组织由细胞分裂到细胞体积增大的转变有关 (Sablowski 和 Meyerowitz 1998)。微阵列技术研究表明, AP3/PI 直接调节负责花瓣和雄蕊细胞形成过程中的基因 (Zik 和 Irish 2003)。

拟南芥 AP3 在花瓣和雄蕊整个发育过程中均表达, 但在非花组织中不表达 (Serrano-Cartagena 等 2000)。而在玉米中 AP3 基因在种子、叶片和根中均表达 (Munster 等 2001; Yu 等 1999; Southerton 等 1998)。Skipper (2002) 利用原位 PCR 技术发现冬乌头 (*Eranthis hyemalis*) 中 B 类基因在发育中的块茎组织的维管束、花梗、胚原基中均有表达, 在茎和叶片中也发现有 AP3 基因的表达。桉树 (*Eucalyptus*)、挪威云杉 (*Picea abies*) 等几个植物中也有研究报道 MADS-box 基因在维管组织中表达 (Decroocq 1999; Sundström 等 1999)。本文结果

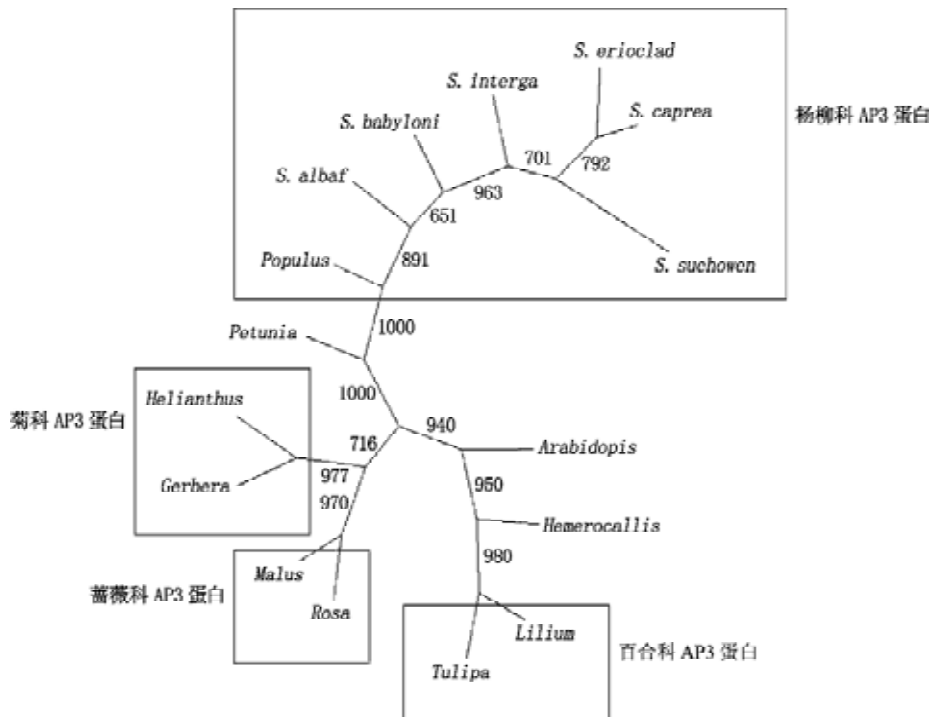


图5 AP3 同源基因的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of homologous AP3 gene

表明, *SsMADS* 基因在不同组织的相对表达量有明显差别, 说明 *SsMADS* 基因在簸箕柳花器官中是特异表达的, 对其花器官的形成起作用。

植物B类基因属于MADS-box 基因家族II型, 包含MADS区、I区、K区和C-末端4个高度保守结构域, 因此也称为MIKC-type MADS-box 基因(Lamb和Irish 2003)。AP3同源基因的突出特点是含有非常保守的MADS-box, 一般认为该区域的功能是与DNA的结合有关。由于MADS-box具有与DNA结合和形成二聚体的功能而参与转录调控, 所以这些基因编码的蛋白属于转录因子。本文结果表明, 在柳属植物中AP3基因同源基因相当保守。分化后碱基的替代事件发生少, 氨基酸序列变化不大。一般认为, 如果蛋白质序列间在至少80个氨基酸左右的区域中具有25%或更高的相似性, 那么它们一般具有相类似的生物学性质, 因而有可能在不同物种中执行着相同功能。所以可以认为, 柳属不同物种的AP3同源基因可能在花器官的发育中执行着相同或相似的功能。

参考文献

- Coen ES, Meyerowitz EM (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31~37
- Decroocq V, Zhu X, Kauffman M, Kyozuka J, Peacock WJ, Dennis ES, Llewellyn DJ (1999). A TM3-like MADS-box gene from Eucalyptus expressed in both vegetative and reproductive tissues. *Gene*, 228: 155~160
- Honma T, Goto K (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development*, 127: 2021~2030
- Honma T, Goto K (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 409: 525~529
- Jack T (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16: S1~S17
- Krizek B, Meyerowitz E (1996). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 122: 11~22
- Lamb RS, Irish VF (2003). Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 6558~6563
- Levy YY, Dean C (1998). The transition to flowering. *Plant Cell*, 10: 1973~1990

- 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
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8: 4321~4325
- Ramaker C, Ruijter JM, Deprez RM, Moorman AFM (2003). Assumption-free analysis of quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339: 62~66
- Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, 92: 93~103
- Serrano-Cartagena J, Candela H, Robles P, Ponce MR, Perez-Perez JM, Piqueras P, Micol JL (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics*, 156: 1363~1377
- Skipper M (2002). Genes from the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages are expressed in developing vascular bundles of the *Tuberous Rhizome*, flowering stem and flower primordia of *Eranthis hyemalis*. *Ann Bot*, 89: 83~88
- Southerton SG, Marshall H, Mouradov A, Teasdale RD (1998). Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol*, 118: 365~372
- Sundström J, Carlsbecker A, Svensson ME, Svenson M, Johansen 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: 253~266
- Theissen G (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 75~85
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A et al (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray). *Science*, 313 (5793): 1596~1604
- Yu D, Kotilainen M, Pöllänen 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
- Zik M, Irish VF (2003). Global identification of target genes regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action. *Plant Cell*, 15: 207~222