

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201904025

张良波, 王旋, 钱成旭, 等. 甜荞 *FeFUL2* 基因的克隆与表达分析 [J]. 广西植物, 2021, 41(4): 591-597.ZHANG LB, WANG X, QIAN CX, et al. Cloning and expression analysis of *FeFUL2* gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Guihaia*, 2021, 41(4): 591-597.

甜荞 *FeFUL2* 基因的克隆与表达分析

张良波, 王 旋, 钱成旭, 刘志雄*

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 为了探索甜荞 *FUL* 同源基因参与花与籽粒发育调控的分子机制, 该文采用同源克隆的方法从甜荞 (*Fagopyrum esculentum*) 长花柱和长雄蕊突变体 (*lpls*) 中克隆到 1 个长 837 bp 的 *FeFUL2* 基因 (GenBank 登录号为 MG779493.1), 其包含长 690 bp 的完整开放阅读框, 编码 1 个由 229 个氨基酸残基组成的 MADS-box 转录因子。通过对 *FeFUL2* 进行分子系统发生、同源蛋白比对与转录因子结构分析, 结果显示 *FeFUL2* 与核心真双子叶植物 AP1/*FUL* 亚家族转录因子中的 euFUL 进化系聚于 1 个进化分支, 属甜荞 euFUL 型 MADS-box 转录因子, 且包含 1 个 57 个氨基酸残基长的高度保守的 MADS 结构域、1 个 69 个氨基酸残基长的次级保守的 K 结构域, 其 C 末端转录激活区在序列长度和氨基酸残基组成上与其他 euFUL 型转录因子差异较大, 但仍含有 2 个 euFUL 型转录因子特有的保守基元: *FUL* motif 和 paleo AP1 motif。用 qPCR 检测基因表达的组织特异性显示: *FeFUL2* 基因在甜荞 *lpls* 突变体的根、茎、叶、花被片、雄蕊、雌蕊和发育 4 d 的幼果中均有表达, 但其在花被片中表达量极显著高于该基因在其他器官中的表达量 (*LSD*, $P < 0.01$)。综合转录因子的结构与基因的表达模式推测, *FeFUL2* 基因与其他 euFUL 型基因的功能可能存在一定差异, 其在花发育过程中可能主要参与甜荞花被片的发育调控。

关键词: 荞麦, 花发育, *FRUITFULL*, MADS-box, 基因表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)04-0591-07

Cloning and expression analysis of *FeFUL2* gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)

ZHANG Liangbo, WANG Xuan, QIAN Chengxu, LIU Zhixiong*

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: In order to uncover the molecular mechanisms of *FRUITFULL* (*FUL*) homologous genes involving in regulating flower and fruit development in buckwheat, an 837 bp of *FeFUL2* cDNA containing a 690 bp full ORF (Open Reading Frame) encoding 229 amino acids (GenBank Accession Number MG779493.1) was isolated from a *Fagopyrum esculentum* mutant line with long pistil and long stamen (*lpls*) through homologous cloning. Moreover, the *FeFUL2* cDNA contains a 30 bp 5'UTR (untranslated region, UTR) and a 117 bp 3'UTR including poly-A. The results showed that the buckwheat *FeFUL2* was classified into the core eudicot euFUL lineages of AP1/*FUL* subfamily MADS-box transcription

收稿日期: 2019-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(31571736, 31771867); 国家公益性行业(农业)科研专项(201303008); 长江大学大学生创新训练项目(2018219) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571736, 31771867); Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201303008); Innovation Training Program for Undergraduates of Yangtze University (2018219)].

作者简介: 张良波(1998-), 主要从事植物遗传育种研究, (E-mail) 782537960@qq.com。

*通信作者: 刘志雄, 博士, 教授, 主要从事植物发育遗传与种质创新研究, (E-mail) zxliu77@yahoo.com。

factors through phylogenetic, protein alignment and sequence analyses. In addition, *FeFUL2* was classified transcription contained a highly conservation MADS-box domain (1–57) with 57 amino acids (aa), a secondary conserved K domain (91–159) with 69 aa, as well as two conserved motifs: FUL motif and paleo AP1 motif lying variable C terminal region. The highly conserved MADS domain was responsible for DNA binding, dimerization and nuclear localization of MADS-domain transcription factors. The secondary conserved K domain was involved in the formation of amphipathic helices and responsible for protein dimerization and multimeric complex formation protein-protein interactions. Finally, the C domain was important for transcriptional activation and multimeric complex formation. Moreover, the C terminal region of *FeFUL2* was variable in sequence and length comparing with other *euFUL*-like transcriptors, which suggested that *FeFUL2* may play different roles regulating flower and fruit development with *FUL-like* homologs from other species. qPCR revealed that *FeFUL2* expression was detectable in all tissues including root, stem, leaf, tepal, stamen, gynoecium and 4-day-old juvenile fruit. However, *FeFUL2* expression level in tepal was significantly higher than those in other organs (*LSD*, $P < 0.01$). In addition, *FeFUL2* expression level in stamen, gynoecium and 4-day-old juvenile fruit displayed no significant differences (*LSD*, $P > 0.05$), but *FeFUL2* expression level in stem and leaf was significantly higher than root (*LSD*, $P < 0.05$). However, *FeFUL2* expression level in stem and leaf showed no significant differences (*LSD*, $P > 0.05$). Above all, our data suggest that the function of *FeFUL2* may show a difference with other *euFUL-like* gene, and *FeFUL2* play a major role involving in perianth development.

Key words: buckwheat, flower development, *FRUITFULL*, MADS-box, gene expression

甜荞 (*Fagopyrum esculentum*) 是蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属食用和保健兼用的粮食作物, 其籽粒含有丰富的赖氨酸、膳食纤维、芦丁和抗氧化活性物等, 具有很高的营养和保健功效 (Quinet et al., 2004; Li et al., 2017); 作为典型的二型花柱作物, 甜荞自然群体中 thrum 型 (短花柱长雄蕊) 和 pin 型 (长花柱短雄蕊) 花植株按 1 : 1 分离, 自花或相同花型植株间授粉不亲和, 仅异型花植株间相互授粉才能正常结实, 产量低, 不利于开展杂交育种工作, 成为制约这一重要经济作物推广应用的瓶颈 (Li et al., 2017)。寻找和选育亲和性好的甜荞新品系 (种), 对增加甜荞种质资源多样性, 开展杂交育种均具有重要的意义。甜荞长花柱和长雄蕊突变体 (long pistil and long stamen, *lpls*) 是课题组从甜荞品种‘北早生’群体中筛选获得的自然变异的株系, 其具有雌雄蕊等长、同型花间授粉能结实, 且与 pin 型和 thrum 型植株杂交也显示出良好的亲和性, 是开展甜荞杂交育种的理想材料 (图版 I)。弄清甜荞 *lpls* 突变株系花序发育、开花以及籽粒发育过程与调控机制, 是合理利用该材料开展杂交工作的前提和基础。

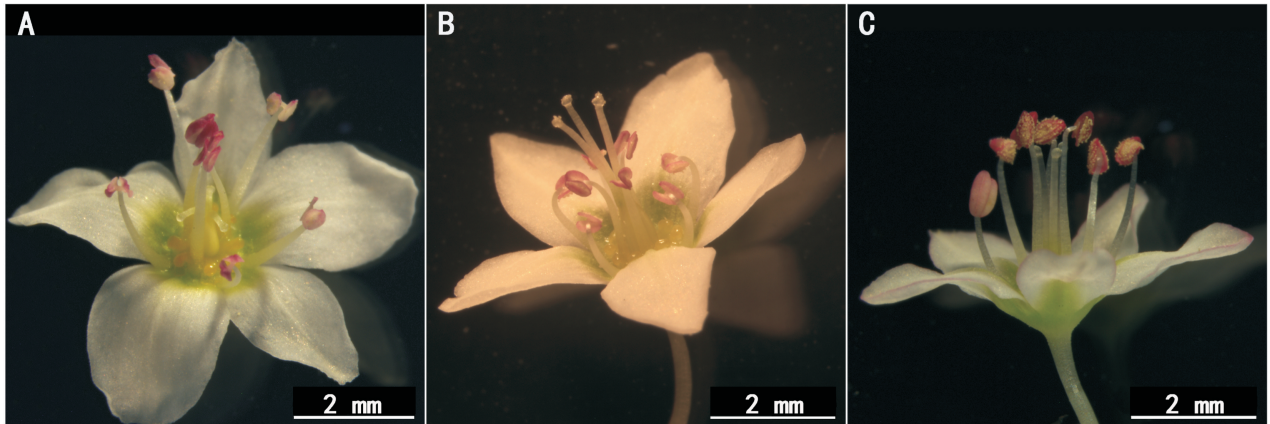
前人在研究模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 花和角果的发育规律与调控机制发现, *FRUITFULL* (*FUL*) 基因编码 MADS-box 基因家族中 *APETALA1* (*AP1*)/*FUL* 进化系转录因子, 其在拟南芥总状花序分生组织、花芽原基、雌蕊、茎和茎生叶

中都有表达, 参与促进开花、花序、花芽的发育与分化, 茎生叶和长角果的发育 (McCarthy et al., 2015)。为弄清甜荞 *FUL* 同源基因的结构以及在花和果实发育调控中功能是否保守, 本研究通过同源克隆分离甜荞 *FUL* 同源基因 *FeFUL2*, 在分析其编码转录因子结构的基础上, 结合 qPCR 检测该基因在甜荞 *lpls* 突变体植株中表达的组织特异性, 从而预测该基因在参与调控 *lpls* 突变体植株花和瘦果发育过程中的作用与功能, 在丰富甜荞 *lpls* 突变体花和瘦果发育调控资料的同时, 能为开展甜荞杂交育种工作和基因工程育种积累资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2018 年 8 月底, 将甜荞 *lpls* 突变体株系的种子播种于长江大学作物遗传育种研究所实验基地的塑胶花盆 (21 cm × 14 cm × 20 cm), 常规水肥管理, 待 9—10 月开花、坐果后分别将花盆搬回实验室, 在超净台上用 RNAase-free 的尖嘴镊子剥取甜荞 *lpls* 突变体的花序、花被片、雄蕊、雌蕊和发育 4 d 的幼果, 置于 2 mL RNAase-free 的 EP 管中, 经液氮速冻, -80 °C 保存备用。先用水冲甜荞 *lpls* 突变体植株的根系, 快速用吸水纸吸取根上水分, 然后用 RNA free 的小剪刀剪取甜荞根尖、幼叶和幼茎, 最后用锡箔纸包好, 经液氮速冻于 -80 °C 保存备用。



A. Thrum 型花(短花柱长雄蕊); B. Pin 型花(长花柱短雄蕊); C. *lpls* 突变体花(长花柱长雄蕊)。

A. Thrum-like flower with short pistil and long stamen; B. Pin-like flower with long pistil and short stamen; C. *lpls* flower with long pistil and long stamen.

图版 I 甜荞的异型花

Plate I Trimorphic flowers of *Fagopyrum esculentum*

1.2 实验方法

1.2.1 甜荞 *FeFUL2* 基因克隆 称取上述 8 种组织各 100 mg, 用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物科技, 北京)分别提取其总 RNA, 操作参照试剂盒说明书上的程序。经电泳、紫外分光光度计检测 RNA 的质量和完整性后, 参照 Li et al. (2017) 的方法合成第一链 cDNA, 根据课题组前期分离的 *FaeseuFUL* 基因(Genbank 登录号: KM386626.1)的 cDNA 序列, 引入适宜的酶切位点设计引物, 从甜荞 *lpls* 突变体中克隆 *FeFUL2* 基因, PCR 扩增的上、下游引物分别为 FeFUL2F 和 FeFUL2R。引物(表 1)合成和 DNA 测序均委托生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
FeFUL2F	5'-TCTAGATTACACTTCTCAAAGATCTAGC-3'
FeFUL2R	5'-GAGCTCATCTATACTCTACTTGTCTGCGTA-3'
qFeFUL2F	5'-GCCAAATCGATTCAGGATCAGAAC-3'
qFeFUL2R	5'-GGCATCTCTCTACCTATTTCTC-3'
qFeactinF	5'-ACCTTGCTGGACGTGACCTTAC-3'
qFeactinR	5'-CCATCAGGAAGCTCATAGTTC-3'

1.2.2 蛋白同源序列比对与分子系统发生分析

将 *FeFUL2* 基因编码的蛋白序列在 NCBI 数据库中执行 Protein Blast 同源搜索比对。选取来源于不同被子植物类群中的同源序列, 用 MEGA 5.0 软件, 选邻接法(neighbour joining, NJ)构建分子系统进化树, 所建树经 1 000 次的自展重复(bootstrap replicate)检验, 确定 *FeFUL2* 基因的进化分支, 以及与其他物种的 FUL 同源蛋白的演化关系(Tamura et al., 2011)。同时用 BioEdit 7.0.9 软件, 选 ClustalW 程序对 *FeFUL2* 转录因子进行结构分析和功能预测。

1.2.3 *FeFUL2* 基因的表达分析 分别提取甜荞 *lpls* 突变体的根、茎、叶、花被片、雄蕊、雌蕊和发育 4 d 幼果的总 RNA, 检测其质量与完整性后, 合成第一链 cDNA。通过实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)技术检测 *FeFUL2* 基因在甜荞上述 7 种组织中表达的特异性和表达量的差异。qPCR 检测所用的基因的上、下游特异性引物分别为 qFeFUL2F 和 qFeFUL2R(表 1); qPCR 检测所用的阳性对照内参基因为甜荞的 *Feactin* 基因(Genbank 登录号: HQ398855.1), 检测特异性引物分别为 qFeactinF 和 qFeactinR(表 1)。qPCR 在 Line-Gene 9600 Plus Real-time PCR Detection System 中进行, 每个样品 3 个生物学重复, 实时荧光定量采用两步法 PCR 扩增标准程序: 95 °C 预变

性 30 s, PCR 反应为 95 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 30 s, 40 个循环。溶解曲线分析为 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 和 95 °C 15 s。

2 结果与分析

2.1 甜荞 *FeFUL2* 基因全长 cDNA 的序列结构与登录

通过同源克隆方法, 直接从甜荞 *lpls* 突变体花序中分离到 *FeFUL2* 基因 cDNA 全长。序列结构分析表明: 甜荞 *FeFUL2* 基因 cDNA 序列全长为 837 bp, 包括 30 bp 的 5'UTR (untranslated region)、690 bp 的完整 ORF (Open Reading Frame) 和 117 bp 的 3'UTR, 编码 229 个氨基酸残基和 1 个终止密码子。其与拟南芥中 *AtFUL* 基因 (Genbank 登录号: NM_125484.4) 同源性最高, 命名为 *FeFUL2* (*Fagopyrum esculentum FUL*), GenBank 登录号为 MG779493.1。

2.2 甜荞 *FeFUL2* 转录因子的结构分析与功能预测

转录因子分子系统发育与进化树重建 (图 1) 显示: 甜荞 *FeFUL2* 属核心真双子叶植物 AP1/*FUL* 亚家族转录因子中的 euFUL 进化系, 与核心真双子叶植物 euFUL 型转录因子聚于 1 个进化分支, 与菠菜 (*Spinacia oleracea*) 的 SpFUL 亲缘关系较近, 同时与拟南芥的 euFUL 型转录因子的氨基酸序列相似性高达 54.55%, 并与核心真双子叶植物 AP1/*FUL* 亚家族转录因子中的 AP1 和 AGL79 进化系分开, 经典分类学中同源蛋白所属植物种属间的进化关系也在树上得以很好地呈现 (图 1)。蛋白同源序列比对 (图 2) 显示: 甜荞 *FeFUL2* 转录因子包含 1 个 57 个 (1~57) 氨基酸残基长的高度保守 MADS-box 结构域, 一个由 69 个 (91~159) 氨基酸残基组成的次级保守的 K 结构域, 其 C 末端转录激活区由 70 个 (160~229) 氨基酸残基组成, 虽然该区域序列长度和氨基酸残基的组成上同其他 euFUL 型转录因子差异较大, 但该区域上仍存在 2 个十分保守的 euFUL 型转录因子特有的基元: FUL motif 和 paleo AP1 motif (Litt & Irish, 2003; Shan et al., 2007)。综上所述, *FeFUL2* 属甜荞 MADS-box 转录因子家族中的 euFUL 型转录因子, 其 M、K 和 C 区关键结构域的保守性说明该转录因子调控花和果实发育的功能会呈现一定的保守

性, 但转录激活区序列长度和氨基酸残基的组成变异会使其功能呈现一定的分化。

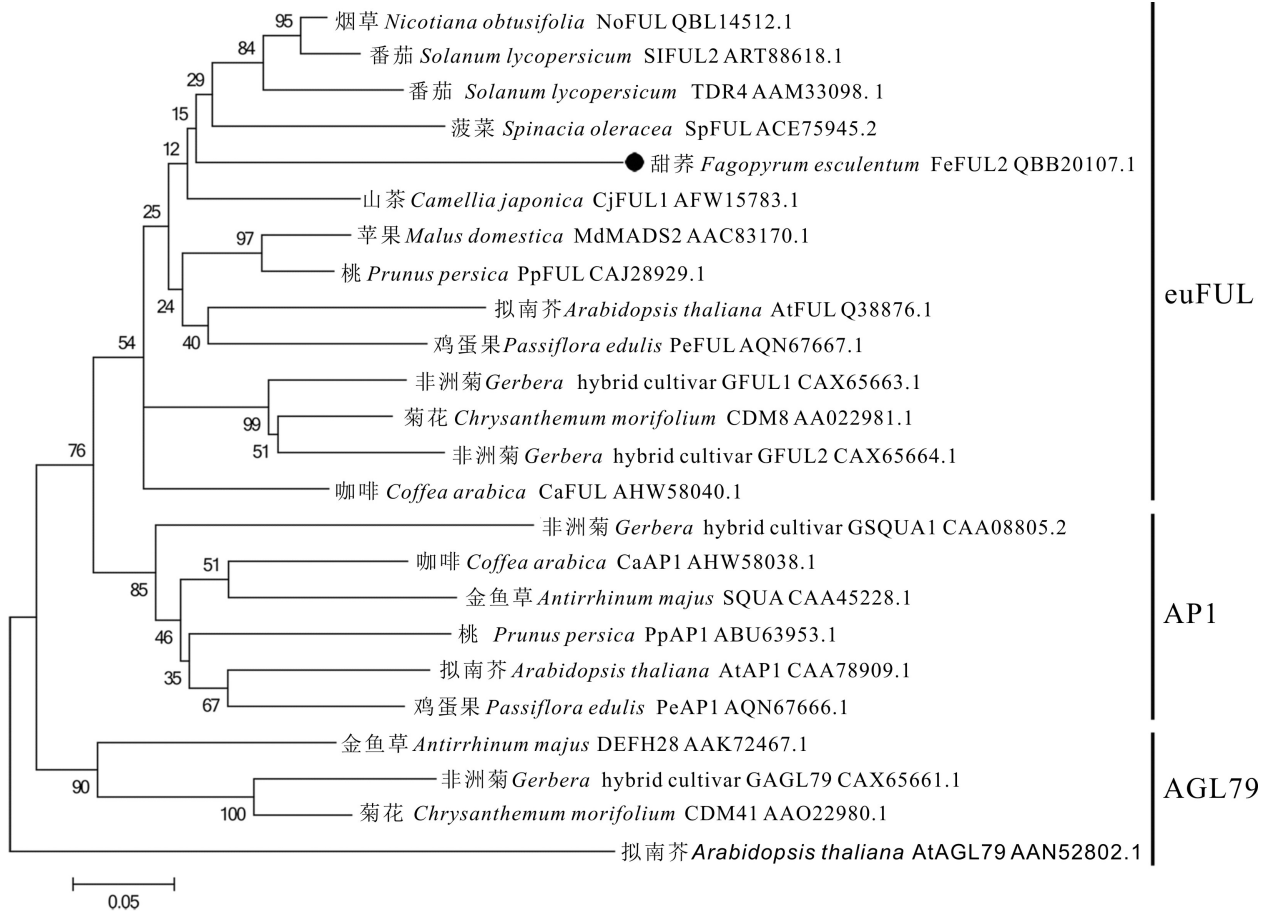
2.3 *FeFUL2* 基因在甜荞中表达的组织特异性

qPCR 检测 *FeFUL2* 基因在甜荞 7 种器官中表达的特异性发现 (图 3): 甜荞 *lpls* 突变体的根、茎、叶、花被片、雄蕊、雌蕊和发育 4 d 的幼果中均能检测到 *FeFUL2* 基因的转录信号。进一步分析 *FeFUL2* 基因在这 7 种器官中的相对表达量发现, 其在花被片中的表达量最高, 极显著高于该基因在其他 6 种器官中的表达量 (*LSD*, $P < 0.01$)。另外, *FeFUL2* 基因在雄蕊、雌蕊和发育 4 d 的幼果等生殖结构中的表达量无显著差异 (*LSD*, $P > 0.05$); 但在甜荞根、茎和叶等营养器官中, *FeFUL2* 基因在茎和叶中的相对表达量显著高于根 (*LSD*, $P < 0.05$), 但茎与叶中的相对表达量无显著性差异 (*LSD*, $P > 0.05$)。

3 讨论与结论

在被子植物 MADS-box 转录因子中, M 区主要负责 DNA 序列的识别与结合、蛋白二聚体形成和转录因子核定位, K 区主要参与蛋白二聚体和多聚体的特异性结合, C 末端结构域主要负责转录激活和参与蛋白多聚体复合物形成, 这 3 个关键的结构域在维持转录因子活性、发挥正常功能起重要作用 (Theißen et al., 2016)。与来源于其他植物 euFUL 型转录因子结构相比, 甜荞 *FeFUL2* 蛋白的 M 区和 K 区在氨基酸组成和序列长度上十分保守, 但其 C 末端转录激活区在氨基酸残基的组成和序列长度上呈现较大的变异, 推测该转录因子在调控花和果实的发育时功能会呈现一定的保守性, 同时也会呈现一定的分化。

前人在研究模式植物拟南芥和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 花发育调控发现, MADS-box 基因的表达模式与其功能有明显的相关性; 因此, 在其他植物中, 可通过 MADS-box 基因的表达模式来预测其功能 (Ma & dePamphilis, 2000)。在蔷薇类 (rosids) 植物拟南芥中, *FUL* 基因编码 MADS-box 基因家族中 AP1/*FUL* 进化系转录因子, 其在花序分生组织、花芽原基、雌蕊、茎和茎生叶中均有表达, 参与促进花序、花芽的分化、雌蕊中胚珠的发育与开花, 同时还参与调控茎生叶和果实的发育 (McCarthy et al., 2015); 拟南芥近缘种油菜 (*Brassica*



分支上的数字表示执行 1 000 次重复计算获得的自展百分比;标尺代表遗传距离。

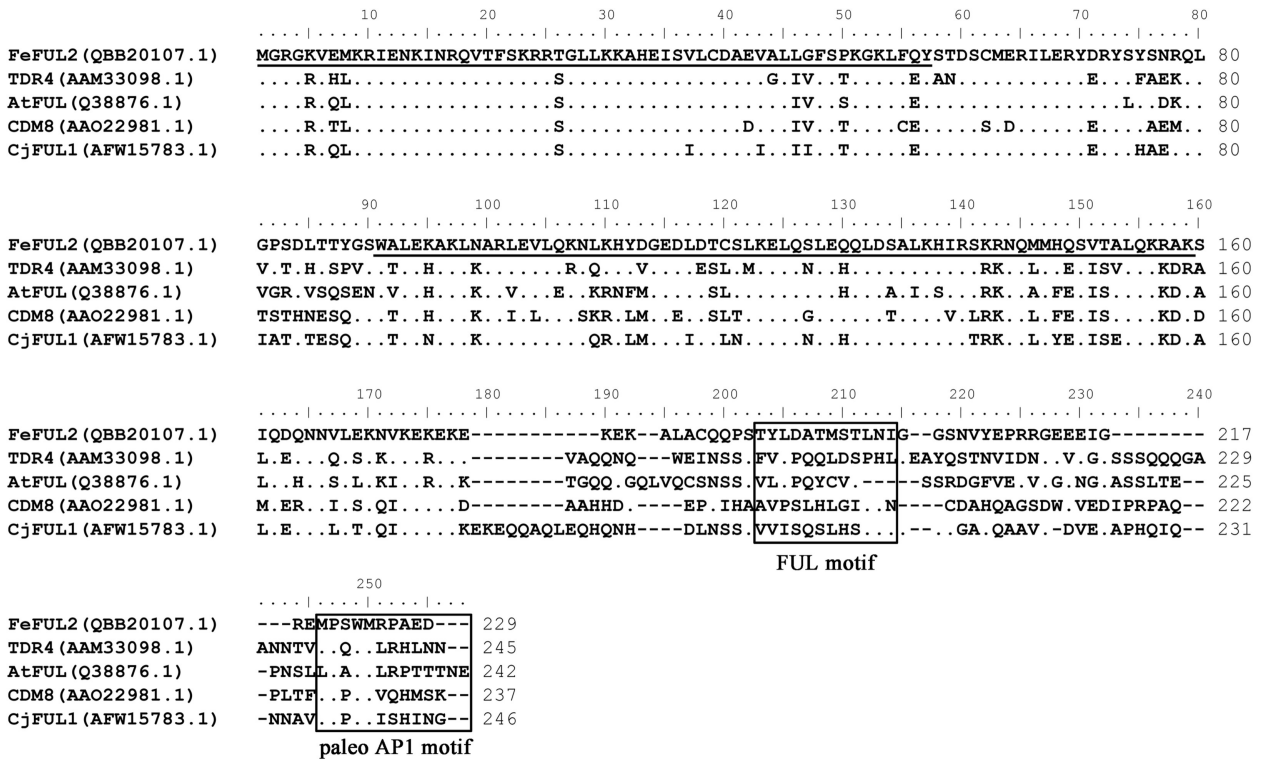
Numbers represent the bootstrap percentage values calculated by 1 000 replicates; The scale bar represents genetic distance.

图 1 *FeFUL2* 与其他植物 AP1/FUL-like 蛋白的分子系统发生分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *FeFUL2* with other AP1/FUL-like proteins from different plants

napus) 的 *FUL-like* 基因则具有参与调控长角果开裂的功能 (Peng et al., 2015)。豆科 (Leguminosae) 植物苜蓿 (*Medicago truncatula*) 有 3 个 *FUL-like* 型基因, 序列相似性高的 *MtFULa* 和 *MtFULb* 在营养生长和生殖发育阶段均有表达, 但在开花前表达量最高, 主要参与促进植物开花, *MtFULc* 在开花后表达量最高, 主要参与促进花的发育 (Jaudal et al., 2015); 大豆 (*Glycine max*) 的 *FUL* 同源基因 *GmFULa* 在根、茎、叶、茎顶端分生组织、花和荚果中均有表达, 但其在花中的表达量最高, 主要参与调控植物的成花转变和开花 (Jia et al., 2015); 鸡蛋果 (*Passiflora edulis*) 的 *FUL-like* 基因 *PeFUL* 不仅在所有花器官和果实中有表达, 其在营养器官中也有表达, 但其在幼果中的表达量最高, 主要参与果实的发育调控 (Scorza et al.,

2017)。在菊类 (asterids) 植物番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中, *FUL-like* 基因 *TDR4* 在雄蕊和果实开始发育时表达, 且在成熟浆果中的表达量最高, 但另一个 *FUL-like* 基因 *SIFUL2* 在所有花器官、果实中均有表达, 两者均参与调控果实的发育和成熟 (Bemer et al., 2012; Maheepala et al., 2019)。在山茶 (*Camellia japonica*) 中, *FUL-like* 基因 *CjAPL1* (*CjFUL1*) 在所有花器官中均有表达, 但其在心皮中的表达量最高, 主要参与促进开花和果实的发育, 而且其在重瓣品种的表达量明显高于单瓣, 说明其可能也参与花被片的发育调控 (Sun et al., 2014; Lyu et al., 2019)。上述研究发现, 核心真双子叶植物 *FUL-like* 基因的表达模式和功能呈现出明显的多样性。蔷薇类和菊类作为核心真双子叶植物最大的 2 个进化分支 (Zeng et al.,



第1个和第2个下画线分别代表 MADS-box 结构域和 K 结构域;方框内的分别为 FUL 和 paleo AP1 motif 结构域; **FeFUL2**. 甜芥; **TDR4**. 番茄; **AtFUL**. 拟南芥; **CDM8**. 菊; **CjFUL1**. 山茶。

The first and the second underlined regions represent the MADS-box and K domains, respectively; The FUL motif and paleo AP1 motif domains in the boxes, respectively. **FeFUL2**. *Fagopyrum esculentum*; **TDR4**. *Solanum lycopersicum*; **AtFUL**. *Arabidopsis thaliana*; **CDM8**. *Chrysanthemum ×morifolium*; **CjFUL1**. *Camellia japonica*.

图2 FeFUL2 蛋白同源序列比对和结构分析

Fig. 2 Alignment and structural analysis of FesFUL2 with other homologous protein sequences

2014),其不同类群的植物,甚至同一科不同植物的 *FUL-like* 基因,表达模式会随序列结构的变化而呈现一定的差异,但主要参与其表达量最高的组织发育与调控。在甜芥中, *FeFUL2* 在营养器官和生殖结构中均有表达,其表达模式与其近缘种菠菜的 *SpFUL* 基类类似(Sather & Golenberg, 2009),但其在花被片中的表达量最高,推测甜芥 *FeFUL2* 基因可能主要参与花被片的发育调控。

前人研究发现,核心真双子叶植物 *euFUL* 型基因是由祖先类型的 *FUL-like* 基因通过1次主要的基因重复后产生(Shan et al., 2007)。基因重复前的 *FUL-like* 基因通常表现出更广泛的表达模式,基部真双子叶植物悬铃木(*Platanus acerifolia*)的 *FUL-like* 基因在营养器官和生殖结构中均有表达,主要参与开花和花发育调控(Zhang et al., 2019);

罂粟科(Papaveraceae)植物罂粟(*Papaver somniferum*)是较为原始的基部真双子叶植物,其 *FUL-like* 基因具真双子叶植物中 *euAP1* 和 *euFUL* 型基因所有的功能,主要参与促进开花、花分生组织特性决定、花被片和果实发育等(Pabón-Mora et al., 2012)。可见, *FUL-like* 基因通过基因重复事件产生的 *euFUL* 型基因在核心真双子叶植物中发生了明显的亚功能化,但其表达模式和功能会伴随被子植物的系统发育与演化发生改变(Litt & Irish, 2003)。甜芥属早期分化的核心真双子叶植物(Brockington et al., 2012),其与菊类植物中菠菜和山茶的亲缘关系较近(Zeng et al., 2014),我们的分子系统发生分析也支持了前人分类学的结果,同时,山茶的 *FUL-like* 基因也具有参与调控花被片发育的功能(Sun et al., 2014), *FeFUL2* 基因

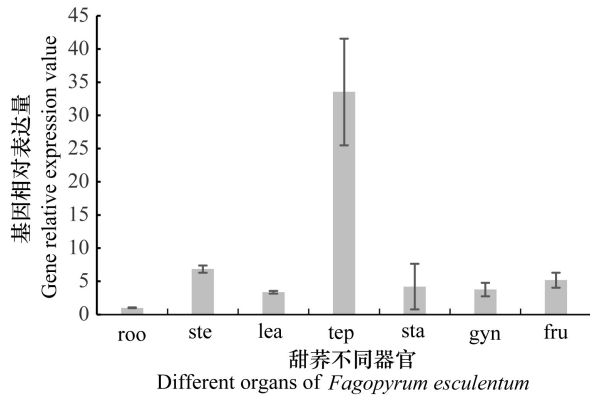


图 3 *FeFUL2* 在甜荞突变体 *lpls* 不同器官中的表达
Fig. 3 Expression analysis of *FeFUL2* in different organs of *Fagopyrum esculentum lpls*

参与调控花被片发育的功能可能是其在伴随物种演化过程中,对祖先类型基因功能的保留,其在甜荞花发育中的具体作用和生理功能仍有待进一步研究。

参考文献:

BEMER M, KARLOVA R, BALLESTER AR, et al., 2012. The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening [J]. *Plant Cell*, 24(11):4437-4451.

BROCKINGTON SF, RUDALL PJ, FROHLICH MW, et al., 2012. 'Living stones' reveal alternative petal identity programs within the core eudicots [J]. *Plant J*, 69(2):193-203.

JAUDAL M, ZHANG L, CHE C, et al., 2015. Three Medicago *MtFUL* genes have distinct and overlapping expression patterns during vegetative and reproductive development and 35S:*MtFULb* accelerates flowering and causes a terminal flower phenotype in *Arabidopsis* [J]. *Front Genet*, 6:50.

JIA Z, JIANG BJ, GAO XW, et al., 2015. *GmFULa*, a *FRUITFULL* homolog, functions in the flowering and maturation of soybean [J]. *Plant Cell Rep*, 34(1):121-32.

LI LY, FANG ZW, LI XF, et al., 2017. Isolation and characterization of the C-class MADS-box gene from the distylous pseudo-cereal *Fagopyrum esculentum* [J]. *J Plant Biol*, 60(2):189-198.

LITT A, IRISH VF, 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development [J].

Genetics, 165(2):821-833.

LYU T, FAN ZQ, YANG W, et al., 2019. *CjPLE*, a *PLENA*-like gene, is a potential regulator of fruit development via activating the *FRUITFUL* homolog in *Camellia* [J]. *J Exp Bot*, doi: 10.1093/jxb/erz142

MA H, DEPAMPHILIS C, 2000. The ABCs of floral evolution [J]. *Cell*, 101(1):5-8.

MAHEEPALA DC, EMERLING CA, RAJEWSKI A, et al., 2019. Evolution and diversification of *FRUITFULL* genes in Solanaceae [J]. *Front Plant Sci*, 10:43.

MCCARTHY EW, MOHAMED A, LITT A, 2015. Functional divergence of *APETALA1* and *FRUITFULL* is due to changes in both regulation and coding sequence [J]. *Front Plant Sci*, 6:1076.

PABÓN-MORA N, AMBROSE BA, LITT A, 2012. Poppy *APETALA1/FRUITFULL* orthologs control flowering time, branching, perianth identity, and fruit development [J]. *Plant Physiol*, 158(4):1685-704.

PENG PF, LI YC, MEI DS, et al., 2015. Expression divergence of *FRUITFULL* homeologs enhanced pod shatter resistance in *Brassica napus* [J]. *Genet Mol Res*, 14(1):871-885.

QUINET M, CAWOY V, LEFÈVRE I, et al., 2004. Inflorescence structure and control of flowering time and duration by light in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. *J Exp Bot*, 55(402):1509-1517.

SATHER DN, GOLENBERG EM, 2009. Duplication of *AP1* within the *Spinacia oleracea* L. *AP1/FUL* clade is followed by rapid amino acid and regulatory evolution [J]. *Planta*, 229(3):507-521.

SCORZA LCT, HERNANDES-LOPES J, MELO-DE-PINNA GFA, et al., 2017. Expression patterns of *Passiflora edulis* *APETALA1/FRUITFULL* homologues shed light onto tendril and corona identities [J]. *Evodevo*, 8:3.

SHAN HY, ZHANG N, LIU CJ, et al., 2007. Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the *AP1/SQUA* subfamily of plant MADS-box genes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 44(1):26-41.

SUN YK, FAN ZQ, LI XL, et al., 2014. The *APETALA1* and *FRUITFUL* homologs in *Camellia japonica* and their roles in double flower domestication [J]. *Mol Breed*, 33:821-834.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 28(10):2731-2739.

THEIBEN G, MELZER R, RÜMPLER F, 2016. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: Linking plant development and evolution [J]. *Development*, 143(18):3259-3271.

ZENG LP, ZHANG Q, SUN RR, et al., 2014. Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times [J]. *Nat Comm*, 5:4956.

ZHANG SS, LU SJ, YI SS, et al., 2019. Identification and characterization of *FRUITFULL*-like genes from *Platanus acerifolia*, a basal eudicot tree [J]. *Plant Sci*, 280:206-218.