

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

真雙子葉植物基群花部 B 群基因之演化研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2621-B-002-022-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學生態學與演化生物學研究所

計畫主持人：胡哲明

計畫參與人員：蘇慧君，蔡依倫

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 9 月 2 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

真雙子葉植物基群花部 B 群基因之演化研究

Studies of evolution of floral B-class genes in basal eudicots

計畫編號：NSC92-2621- B-002-022

執行期限：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

主持人：胡哲明 國立台灣大學生態學與演化生物學研究所

共同主持人：

計畫參與人員：蘇慧君，蔡依倫 國立台灣大學生態學與演化生物學研究所

一、中文摘要

雖然花部器官決定的 ABC 模組解釋了大部份被子植物花部特徵的形成，但在被子植物基群以及真雙子葉基群的植物，其花部器官決定的基因表現仍存在許多變異。在真雙子葉植物基群及核心真雙子葉植物的基群的花部大小以及花被片的輪數都與典型核心真雙子葉植物有很明顯的差異，比如昆欄樹的花被片缺失，而檀香目植物的花被片通常只有一輪。顯然在此之中必定在花部發育的調控中發生了一些未知但重要的改變，因此這些植物在探討被子植物花被片的演化上扮演著非常重要的角色。近年來的研究顯示，在 ABC 三群基因在演化至核心真雙子葉植物的過程中各發生了一次主要的基因重複事件。然而，二個 B 群同源基因的系群只有其中之一在此主要重複事件中固定下來，而變成 *euAP3* 或 *TM6* 次系群。因此，這樣的重複事件可能與真雙子葉植物基群花部特徵的多樣性有關。本計畫分別自演化上屬於關鍵類群的黃楊科(臺灣黃楊)、昆欄樹科(昆欄樹)、第倫桃科(第倫桃)以及檀香目植物(百蕊草、桐樹桑寄生以及高氏桑寄生)中選植花部 B 群同源基因，希望能釐清 B 群同源基因重複事件是否在真雙子葉植物基群中發生。在六種植物中，一共得到 17 個與 B 群同源基因相似的 cDNAs 序列。譜系分析結果顯示，前兩種植物具有 *paleoAP3* 同源基因，而後四種植物則具有 *euAP3* 或 *TM6* 同源基因。比較不同譜系分

析的結果後，本研究將 B 群同源基因的重複事件的發生時間推定於昆欄樹科出現之後，核心真雙子葉植物分歧前的這段演化期間。此外，選汰壓力偵測的結果亦顯示 *PI-like* 基因系群或是 *AP3-like* 基因系群在各演化階段均受到強烈的純化選汰 (purifying selection) 壓力影響，尤其在被子植物基群與真雙子葉植物基群之間，選汰壓力的變動相當地顯著，但是基因重複與選汰壓力在不同植物類群間的關連性，仍有待進一步的釐清。

關鍵詞：真雙子葉植物；B 群基因；基因重複；選汰限制

Abstract

Although the floral ABC model is generally accepted as ubiquitous in flowering plants, variation in gene expression has been found in basal angiosperms and basal eudicots. Accordingly, the basal eudicots and basal core eudicots show highly variable floral features in terms of flower size and floral organ numbers, such as the absence of perianth in *Trochodendron aralioides* and reduced flowers in Santalales. These plants are indeed critical to understand the evolutionary developmental program of perianth evolution in flowering plants. Previous studies have shown that there is a major duplication event of all ABC class genes along the branch

leading to core eudicot lineages. However, only one of the two B class homologues (*AP3*-like) is found duplicated and fixed in this major event, i.e. to eu*AP3* and *TM6* sublineages, but not the *PI*-like homologues. Such duplication may be responsible to the diversification of floral features among basal eudicots. Here we selected representative taxa in flowering plants to examine the evolution B class gene duplications and the change of selection pressure among lineages. Seventeen cDNA clones encoding B class gene homologues were newly determined from *Buxus microphylla* ssp. *sinica*, *Trochodendron aralioides*, *Dillenia indica*, *Thesium chinense*, *Loranthus kaoi* and *Loranthus delavayi*. All of these taxa have one to three *PI* homologues, and various *AP3* homologues. Results from phylogenetic analysis suggest that the first two taxa have paleo*AP3* homologues whereas the later four are most likely having either *TM6* or eu*AP3*-like homologues instead. Based on phylogenetic analysis, we proposed the eu*AP3*/*TM6* duplication occurred after the separation of the Trochodendraceae but before the divergence of the core eudicots. Furthermore, the analysis for detecting selective constraints also suggests that both *PI* and *AP3* lineages have been subjected to strong purifying selection, and the switch of selective constraint is apparently present between basal eudicots and core eudicots. A thorough survey is necessary to elucidate the correlations between gene duplications and the selective constraints among different clades of basal and core eudicots.

Keywords: Eudicots, B-class gene, gene duplication, selective constraint

二、計畫緣由與目的

大部份真雙子葉植物的花都具有兩輪不孕性的構造，較外輪者通常稱為花萼，而內輪的通常稱為花瓣。然而僅依據位置的不同而給予花被定義常常會造成一些問

題。真雙子葉植物基群及核心真雙子葉植物的基群常有花被輪數的減少或缺失並在形態上有很大的變異，顯然在此之中必定在花部發育的調控中發生了一些未知但重要的改變，因此這些植物在探討被子植物花被片的演化上扮演著非常重要的角色。

有趣的是，被子植物開花的基本調制系統(即 floral ABC model) (Coen & Meyerowitz 1991)，在被子植物基群以及真雙子葉植物基群中，就有發現相當程度的變異存在(Baum 1998, Kramer & Irish 2000, Lamb & Irish 2003)。其中在各群基因中，發現了一些可能相當重要的基因重覆型式，尤以 B 群基因的重覆情形可作為一個代表(Irish 2003)。被子植物的 B 群基因主要可以依其 C- domain 之預期轉譯的胺基酸序列，分成 *AP3*-like 以及 *PI*-like 兩主要系群。而這兩個系群則被認為是在被子植物起源前的所發生的一次基因複製。其中 *AP3*-like 系群內又可再依其 C-domain 之預期轉譯的特定胺基酸序列再分成 *TM6*-like、eu*AP3*-like 以及 paleo*AP3*-like 三個次系群，由於 *TM6*-like 及 eu*AP3*-like 基因存在於大部分核心真雙子葉植物中，而在被子植物基群的植物只存在 paleo*AP3*-like 基因，因此在真雙子葉植物的基群以及核心真雙子葉植物的演化之間可能還有一個 B 群基因複製的情況發生以形成 *TM6* 及 eu*AP3* 兩個次系群(Kramer et al. 1998, Kramer & Irish 2000)。

至於這些基因系群在演化上固定的確切發生時間，以往只大約推測在核心真雙子葉基群附近。故本研究主要在真雙子葉植物基群以及核心真雙子葉植物的之中選取了第倫桃(*Dillenia indica* L.)、昆欄樹(*Trochodendron aralioides* Sieb. & Zucc.)、臺灣黃楊(*Buxus microphylla* Sieb. & Zucc. ssp. *sinica* (Rehd. and Wils.) Hatusima)、百蕊草(*Thesium chinense* Turcz.)、桐樹桑寄生(*Loranthus delavayi* Tiegh. ex Leconte)以及高氏桑寄生(*Loranthus kaoi* (Chao) Kiu)等六種植物作為材料。除了藉由不同的譜系分析以檢視其 B 群基因的重複狀況外，同時亦分析其各功能 domain 的選汰限制

(selective constraint)以瞭解 B 群基因重複事件發生前後其分子演化的選汰壓力，一方面希望對於複製基因的演化過程有更進一步的探討，另一方面亦希望對於被子植物花被片的演化過程提供基因序列演化上的訊息。

三、研究結果與討論

一、樣本採集

本論文中所採用的新鮮植物材料包括了第倫桃、昆欄樹、臺灣黃楊、百蕊草、桐樹桑寄生以及高氏桑寄生等六種植物的整個花序或花部各個部位以及葉子分別自植株新鮮採集後迅速以液態氮冷凍並帶回保存於-80°C 冰箱儲藏。

二、B 群同源基因的分選殖

利用 3' RACE (Rapid Amplify of cDNA Ends) (GibcoBRL) 配合上 Kramer 等人(2003)和 Litt & Irish (2003)針對花部器官決定基因所設計的引子，進行花部 B 群基因的選殖，將預期大小的片段與 pGEMT-Easy 載體(Promega)接合，以大腸桿菌進行轉殖，平均得到 50~150 個期望大小得質體，並選取 30~114 個質體進行定序，共得到 17 個與 B 群基因相似的同源序列 (Table 1)，而每個 B 群同源基因都至少都有來自 2 個獨立菌株的定序確定。隨後以 CLUSTALX (Thompson et al. 1997)進行排序分析及 MacClade 4.06 (Maddison & Maddison 2000)修飾排序。由預期胺基酸序列排序結果顯示這些基因序列都具有高度保守性的 M-I-K-C 區域(Fig.1)。

Table 1 本研究所得到的 *PISTILLATA* 及 *APETALA3* 同源基因

Species	No. clones sequenced	No. clones	
		<i>PISTILLATA</i>	<i>APETALA 3</i>
<i>Dillenia indica</i>	47	<i>DiiPI-1</i> (9), <i>DiiPI-2</i> (7)	<i>DiiAP3</i> (7) <i>DiiTM6</i> (8)
<i>Loranthus kaoi</i>	30	<i>LokPI</i> (3)	<i>LokTM6</i> (4)
<i>Loranthus delavayi</i>	43	<i>LodPI</i> (2)	<i>LodTM6</i> (15)
<i>Thesium chinense</i>	57	<i>ThePI</i> (10)	<i>TheTM6-1</i> (7), <i>TheTM6-2</i> (3)
<i>Trochodendron aralioides</i>	114	<i>TroPI-1</i> (14), <i>TroPI-2</i> (8) <i>TroPI-3</i> (5)	<i>TroAP3</i> (19)
<i>Buxus microphylla</i> ssp. <i>sinica</i>	30	<i>BumPI</i> (3)	<i>BumAP3</i> (8)

註：括弧為單一基因所得之獨立菌株數目

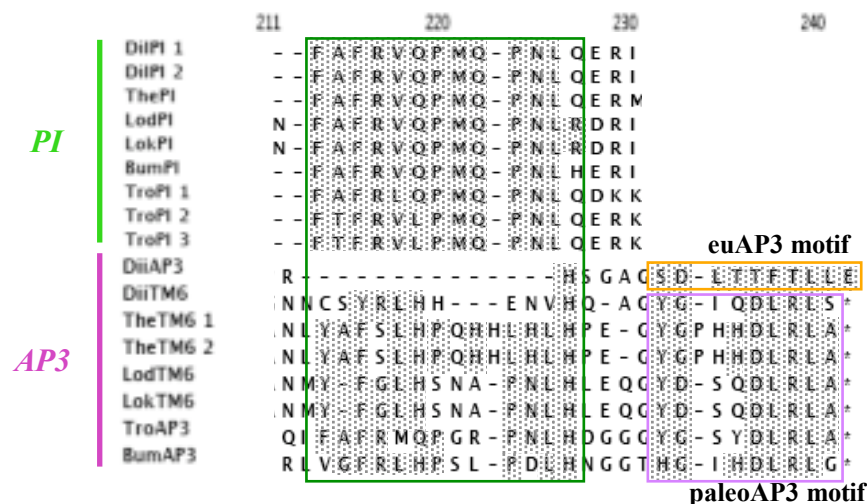


Fig.1 本研究所選殖之B群基因C端預期胺基酸序列排列。上方數值為全長胺基酸排序之序號，其中PI motif, euAP3 motif, paleoAP3 motif 以方框標示。

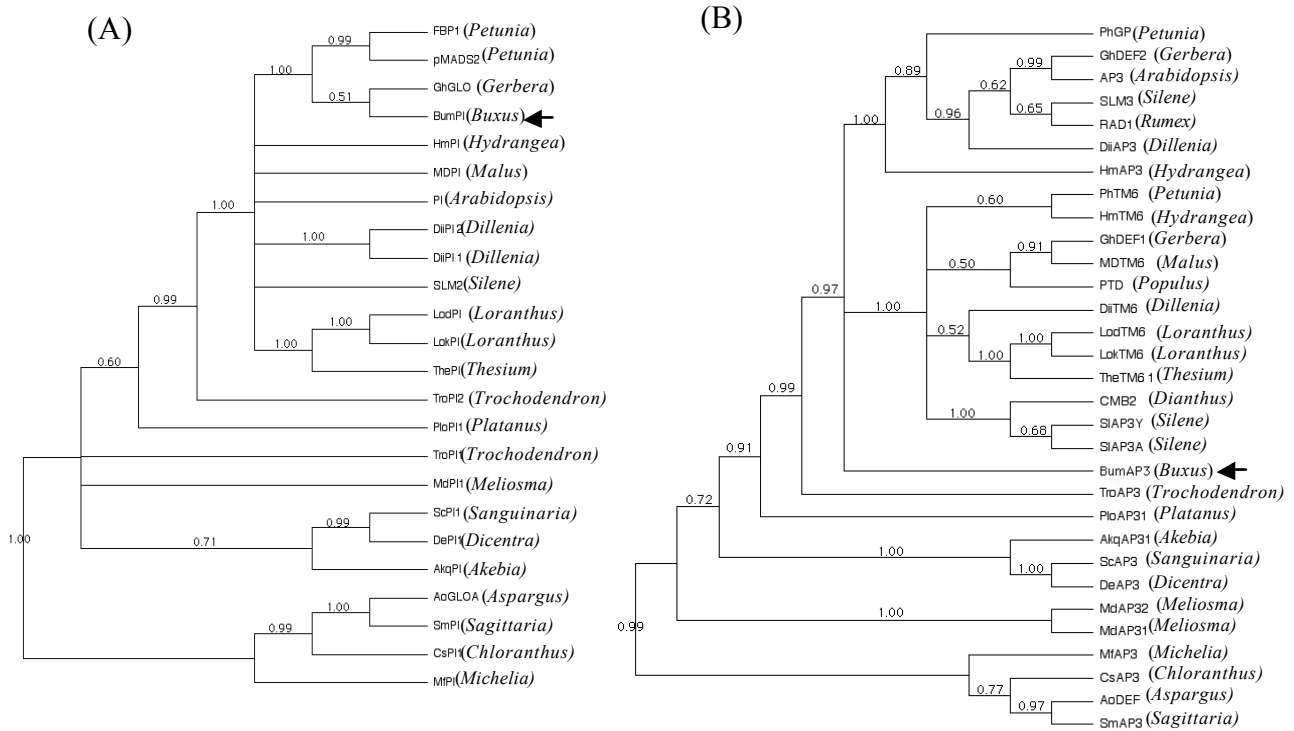


Fig.2 B群基因系群核苷酸序列之譜系樹建構結果。以貝葉氏導出法建構(A)PI-like基因系群 (B)AP3-like基因系群之譜系樹，上方數值為其後驗概率(Posterior probability)，箭頭標示為臺灣黃楊的位置。

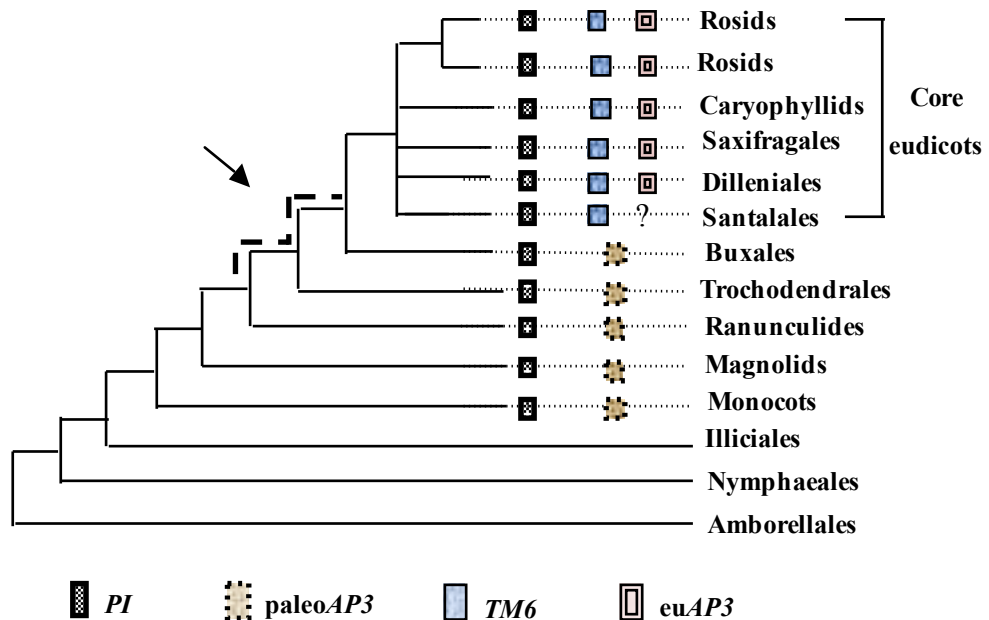


Fig.3 B群基因重複示意圖。B群基因在現生的被子植物演化過程中，已由一次主要的重複事件產生現存的PI及AP3基因系群。AP3-like系群之重複事件的發生時間應在昆欄樹科之後，核心真雙子葉植物前的這段期間。

三、B 群同源基因的譜系分析

為瞭解本研究所得 B 群基因的正確譜系關係以及基因重複事件所發生的時間點，本研究建構大規模的 B 群基因譜系樹，加入更多的物種序列分別以鄰近連接法 (Neighbor-joining analysis)、高度簡約分析 (Most parsimony analysis) (PAUP*, Swofford 2002) 以及貝葉氏導出式分析 (Bayesian inference analysis) 進行更完整的譜系樹的建構。譜系分析簡要結果如 Figs. 2 & 3 所示，重要重複事件的發生時間應在昆欄樹科分歧之後，核心真雙子葉植物系群演化前的這段期間。而這段演化期間，正是各式花被明顯的形態變異及花被輪數的缺失所在，故重複事件後序列的變異是否直接改變花部發育的遺傳機制，並造成後來核心真雙子葉植物花被輪數的固定，是未來研究的重點。此外，euAP3 及 TM6 次系群是否在重複事件後仍擁有重複前的功能，或是進一步演化出新功能，亦是未知但重要的問題。除了可繼續由基因序列演化上的訊息作探討外，將來亦有待更細部的基因功能分析。

四、輻射演化的偵測

利用 PAML3.14 (Yang 1997) 的子程式 codeml 偵測 B 群基因的演化過程中在不同演化階段中不同 domains 間非同義取代比率 (dN) 與同義取代比率 (dS) 的比值 (ω)，以對應比較 B 群基因在演化的過程中所面臨的篩選壓力。此外，本研究亦進行正向選汰測試，以偵測 B 群基因序列中受到正向選擇的核苷酸位置。藉由 B 群基因不同演化階段選汰壓力的分析結果顯示，具有花部器官決定功能的 PI 及 AP3 基因系群都明顯受到純化選汰的壓力，表示其受到相當高的功能限制而就各序列片段亦偵測到此二基因系群在不同的演化階段反應出不同的選汰壓力。

其中 M-domain 因具 DNA-binding 的特性，會直接影響下游的基因調控，因此有最大的純化選汰壓力，而 I, K, C domains 雖影響蛋白質複合體之形成，但純化選汰的壓力相對較低，有可能是個別序列位置並沒有 M-domain 要求得如此嚴謹，亦有可能是部份基因位置同時受到另一股正向選汰的壓力影響而造成。資料分析亦顯示，在被子植物不同的演化階段中，面臨了不同的選汰壓力。在綜合的選汰壓力比較結果可發現從被子植物基群到真雙子葉植物基群階段，有急劇的變動情形產生，造成純化選汰的壓力呈現相對緩和的現象，其中以 PI 最為顯著。

對 AP3 基因系群而言，不同序列片段之間以 M-domain 在被子植物三個演化階段有顯著分歧的選汰壓力。另外，雖然 AP3 基因系群內的主要重複事件造成其預期轉譯的胺基酸序列 C-端保守性 motif 的改變，但如 Vandebussche 等人 (2004) 的研究指出，這樣的變化只要經由部分區域的鹼基序列進行簡單平移突變即可形成。因此，AP3 基因系群的可能演化過程是首先在真雙子葉植物的起源時，其 M-與 C-domain 出現了特定位置重要的改變，之後在演化中發生基因重複造成 euAP3 及 TM6 次系群的產生，在真雙子葉植物基群中，不論是 PI 系群或是 AP3 的次系群，其 I, K, C domain 的 ω 值是被子植物基群階段之 ω 值的十倍以上，顯示真雙子葉植物中，降低純化選汰的壓力非常明顯，其中 PI 系群各 domain 之增幅均是二倍以上。然而，純化壓力的減緩，乃導因於非同義取代的增加，若與基因正向選汰位置之偵測結果 (Fig. 5) 相結合，則這些位置很可能是高 dN/dS 的主要貢獻者，在真雙子葉植物基群中，不論是 PI 系群或是 AP3 的次系群，這個效應都非常顯著，然而到了核心真雙子葉植物時， ω 值明顯又有下降的趨勢，尤以 PI 系群的 I-與 C-domain 為最，而在 AP3 系群的偵測結果亦顯示，euAP3 及 TM6 二次系群的 M-domain 純化選汰壓力亦有提高的現象，亦暗示在重複事件後重要功能限制

的情形，且在二次系群間的選汰壓力有分歧的趨勢，euAP3 次系群的純化選汰壓力較 TM6 次系群來得高，這或許符合前人的推估認為 euAP3 次系群在重複事件後獲得與核心真雙子葉植物花瓣發育相關的新功能並可能對於花部形態的演化有重要的影響力(Lamb and Irish 2003)。

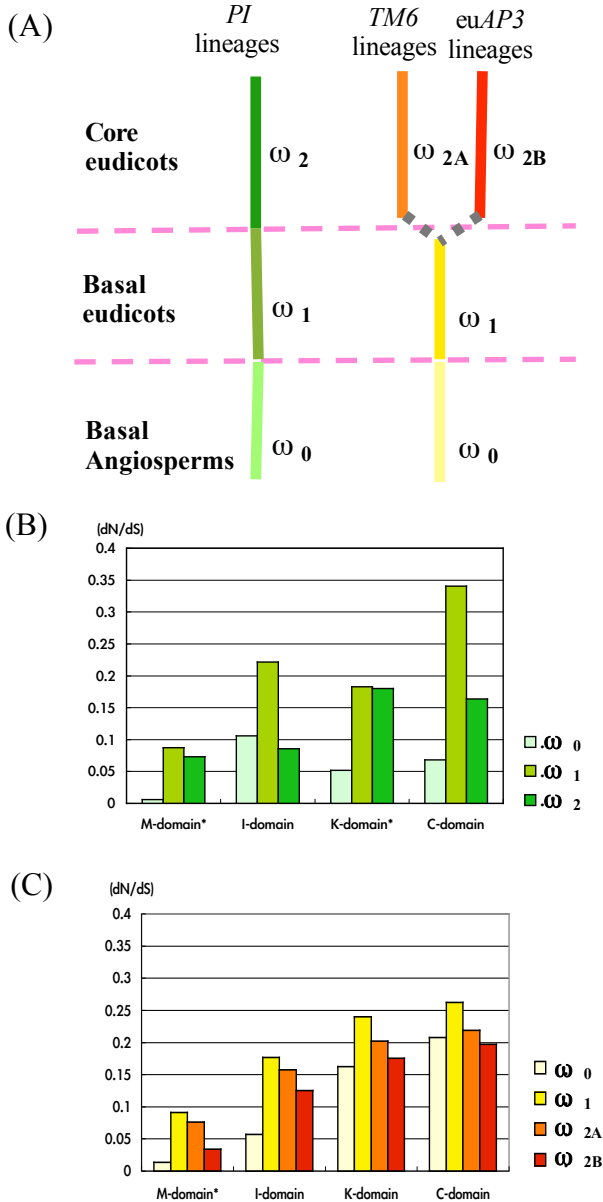


Fig.4 不同演化階段B群基因序列取代比率示意圖。(A)PI-like基因系群可以對應AP3區分為三個階段期，分別為被子植物基群期 ω_0 、真雙子葉植物基群期 ω_1 及核心真雙子葉植物期 ω_2 ，而AP3-like 基因系群，有四個 ω 值，包括了被子植物基群階段的 ω_0 、真雙子葉植物基群階段的 ω_1 、核心真雙子葉植物之TM6-like次系群階段的 ω_{2A} 及其euAP3-like次系群階段的 ω_{2B} 。(B) (C)為各演化階段之不同domains各別估算之 ω 值。

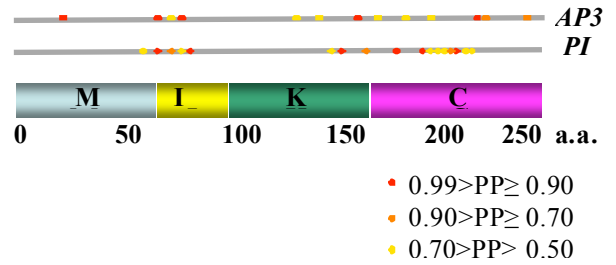


Fig.5 受正向選汰之B群基因系群位置示意圖。PP為 $\omega > 1$ (正向選汰)之機率。

在演化的過程中，即使只有短暫的正向選汰時期亦可能造成蛋白質關鍵性餘基的改變，而許多的研究亦顯示，對於編碼區(coding region)序列的改變，可對於基因功能有顯著的影響。在本研究正向選汰偵測中亦顯示：對AP3-like基因系群而言，受到正向選汰的基因位置較少且零星分布於I-domain、K-domain及C-domain間，而對PI-like基因系群而言，受到正向選汰的基因位置較集中分布於I-domain及C-domain中間區域的位置，再對應到PI系群基因在真雙子葉植物基群時期選汰壓力急劇的變動情形(尤以C-domain為最)，因此亦呼應AP3系群基因可能為配合PI系群基因發揮功能而有相當的選汰壓力，進一步以促使核心真雙子葉植物AP3系群基因主要重複事件的形成。此外，關於euAP3次系群及TM6次系群在C端保守序列的平移突變，則可能是AP3系群基因的選汰過程中，為對應PI系群基因的C-domain而突變產生的二種型式的C-motif。整體而言，B群基因應是在真雙子葉植物基群階段其特定基因位置受到正向選汰，導致新功能的產生，並因新功能的重要性，隨即受到強烈的功能限制而固定下來，這樣的現象則由純化選汰壓力提高的現象反應出來。

四、計畫成果自評

本計畫的研究結果，除了釐清B群基因重複事件發生的時間點外，亦對於重複基因分歧的選汰壓力有更深一層的認識，雖然基因重複與選汰壓力在不同植物類群間的關連性，但仍有待進一步的釐清。而

整個演化的實際過程，可能亦比我們想像中來得更複雜，但藉由 B 群基因重複模式的研究，或許可以讓我們對於基因的演化過程，以及被子植物花被形態變異的演化提供更多的討論空間。其中仍有許多未知之處，有待進一步的研究。

五、參考文獻

- BAUM, D. A. 1998. The evolution of plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 79-86.
- COEN, E. S., AND E. M. MEYEROWITZ. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- IRISH, V. F. 2003. The evolution of floral homeotic gene function. *BioEssays* 25: 637-646.
- KRAMER, E. M., R. L. DORIT, AND V. F. IRISH. 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, E. M., AND V. F. IRISH. 2000. Evolution of the petal and stamen developmental programs: evidence from comparative studies of the lower Eudicots and basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 161: S29-S40.
- KRAMER, E. M., V. S. DI STILIO, AND P. M. SCHLUTER. 2003. Complex patterns of gene duplication in the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of the Ranunculaceae. *International Journal of Plant Sciences* 164: 1-11.
- LAMB R.S, IRISH V.F. 2003. Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* (11): 6558-63.
- LITT, A., AND V. F. IRISH. 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics* 165: 821-833.
- MADDISON, D. R., AND W. P. MADDISON. 2000. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA
- THOMPSON, J. D., D. HIGGINS, AND T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- VANDEBUSSCHE, M., J. ZETHOF, S. ROYAERT, K. WETERINGS, AND T. GERATS. 2004. The duplicated B-class heterodimer model: Whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* 16: 741-754.
- YANG, Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS* 13: 555-556.