

Université de Montréal

Identification de gènes impliqués dans la variation morphologique des fleurs  
entre deux espèces du genre *Rhytidophyllum*

Par Valérie Poulin

Département de Sciences biologiques,  
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de *Master of Science* (MSc)  
en Sciences biologiques option Recherche en biologie

Août 2019

© Valérie Poulin, 2019

Université de Montréal

Département de Sciences biologiques / Institut de Recherche en Biologie Végétale,  
Faculté des Arts et Sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Identification de gènes impliqués dans la variation morphologique des fleurs  
entre deux espèces du genre *Rhytidophyllum***

*Présenté par*

**Valérie Poulin**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Daniel Kierzkowski**

Président-rapporteur

**Simon Joly**

Directeur de recherche

**Daniel Schoen**

Membre du jury

## Résumé

Les adaptations florales à des pollinisateurs comme les changements de forme de la corolle entraînent souvent un isolement reproducteur et donc la spéciation. Malgré leur importance écologique, les mécanismes génétiques à l'origine de cette diversité de caractères sont encore mal compris, surtout en dehors des espèces modèles. L'objectif de mon projet de maîtrise était donc d'identifier les gènes impliqués dans la variation de la forme de la corolle entre deux espèces du genre *Rhytidophyllum* (famille des *Gesneriaceae*), qui ont des modes de pollinisation différents. La première, *R. rupincola*, a des fleurs tubulaires et est strictement pollinisée par les colibris, tandis que la seconde, *R. auriculatum*, a des fleurs plus ouvertes et est pollinisée par les colibris et les chauves-souris. Dans cette étude, nous avons fait une revue de littérature et utilisé une approche de transcriptomique comparative pour identifier des gènes candidats qui pourraient expliquer la variation de la forme florale entre *R. auriculatum* et *R. rupincola*. Nous avons ensuite testé leur association avec la variation de la forme de la corolle en utilisant la cartographie de loci de traits quantitatifs (QTLs) pour une population hybride F2. Les résultats ont montré que 7 des 29 gènes candidats étaient associés à 8 QTLs différents. La répartition et la fonction supposée de ces gènes suggèrent que la forme de la corolle est un trait complexe. Ce type d'étude est rarement entrepris chez des espèces non-modèles, mais il est important afin d'intégrer la génétique du développement floral dans une perspective évolutive.

**Mots-clés :** *Evo-Devo*; Morphologie florale; Forme de la corolle; Pollinisation; *Gesneriaceae*; Cartographie de QTL; Transcriptomique comparative; Gènes candidats; Espèces non-modèles.

## **Abstract**

Floral adaptations to specific pollinators like corolla shape changes often result in reproductive isolation and thus speciation. But despite their ecological importance, the genetic mechanisms behind this diversity of traits are still poorly understood, especially outside model species. Hence, our goal is to identify genes involved in corolla shape variation between two species of the *Rhytidophyllum* genus (*Gesneriaceae* family) from the West Indies, which is characterized by shifts in pollination modes during its evolution. The first one, *R. rupicola*, has a tubular corolla and is strictly pollinated by hummingbirds. The second one, *R. auriculatum*, has more open flowers and is pollinated by both hummingbirds and bats. We know from previous work that the variation in morphological floral traits between these species is explained by a few quantitative trait loci (QTLs) of moderate to small effect (Alexandre et al., 2015), but we still do not know which genes underly these loci. In this study, we surveyed the literature and used a comparative transcriptomic approach to identify candidate genes that could explain floral variation between *R. auriculatum* and *R. rupicola*. We then tested their association with corolla shape variation using QTL mapping for a F2 hybrid population. Results showed that 7 out of 29 candidate genes were included within 8 different QTL. The number, repartition and putative function of these genes suggest that corolla shape is a complex trait. This sort of investigation is rarely undertaken in non-model species, but is important to integrate developmental genetics with an evolutionary perspective.

**Keywords:** Evo-Devo; Flower Morphology; Corolla Shape; Pollination; *Gesneriaceae*; QTL Mapping; Comparative transcriptomics; Candidate Genes; Non-model species

## **Table des matières**

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION.....	1
1.1. Constitution du mémoire.....	1
1.2. Régulation génétique du développement floral.....	2
1.2.1. Initiation du développement floral.....	2
1.2.2. Modèle ABC et gènes homéotiques.....	2
1.2.3. ‘Quartet model’ et interaction des gènes homéotiques.....	3
1.2.4. Point de vue évolutif et modifications du modèle ABC.....	4
1.3. Bases génétiques de la morphologie des pétales.....	5
1.3.1. Croissance des pétales.....	5
1.3.2. Taille des pétales.....	6
1.3.3. Symétrie bilatérale.....	7
1.3.4. Fusion des pétales.....	9
1.4. Perspectives.....	11
1.5. Description du projet.....	13
1.5.1. Avant-propos : l’évolution et la forme des pétales.....	13
1.5.2. Introduction au groupe d’étude.....	15
1.5.3. Objectifs et hypothèses de recherche.....	16
CHAPITRE 2 – UNRAVELLING GENES SHAPING COROLLA MORPHOLOGY IN THE <i>RHYTIDOPHYLLUM</i> GENUS.....	17
2.1. Introduction.....	17
2.2. Material and methods.....	21
2.2.1. F2 hybrid population.....	21
2.2.2. Identifying candidate genes involved in floral variation.....	22
2.2.3. SNP identification and validation.....	23
2.2.4. Genotyping of the F2 hybrid population.....	23
2.2.5. Linkage map construction.....	24
2.2.6. Phenotypic data.....	24
2.2.7. Quantitative trait loci detection.....	25
2.2.8. Protein domain prediction and polymorphism localization.....	26

2.3.	Results .....	26
2.3.1.	Twenty-nine candidate genes potentially involved in floral variation between the two species of <i>Rhytidophyllum</i> .....	26
2.3.2.	Twenty-two candidate genes were successfully genotyped .....	27
2.3.3.	Linkage map and QTL mapping .....	28
2.3.4.	Protein domain predictions .....	29
2.4.	Discussion .....	30
2.4.1.	Comparison of methods for the research of candidate genes .....	30
2.4.2.	The genetics of corolla shape transition between pollination syndromes .....	30
2.4.3.	Molecular and biological functions of the seven genes under corolla shape QTLs .....	33
2.5.	Conclusion .....	38
2.6.	Tables and figures .....	39
2.7.	Supplementary information .....	43
CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE .....		44
3.1.	Rappel de la problématique .....	44
3.2.	Retour sur les objectifs et hypothèses .....	45
3.3.	Critique des résultats .....	46
3.3.1.	Sept gènes parmi 29 candidats .....	46
3.3.2.	Caractérisation des sept gènes et polymorphismes .....	47
3.4.	Perspectives .....	48
BIBLIOGRAPHIE .....		51

## **Liste des tableaux**

<b>Table 1.</b> Information about the candidate genes, steps completed for each marker, and number of candidate genes left after each step.....	40
<b>Table 2.</b> Information about the 14 QTLs identified.....	41

## **Liste des figures**

<b>Figure 1.</b> L'évolution du modèle ABC de 1990 à 2010. ....	5
<b>Figure 2.</b> Contrôle génétique de la symétrie bilatérale chez <i>A. majus</i> .....	8
<b>Figure 3.</b> Modèle du contrôle génétique de la formation de la corolle tubulaire chez <i>Mimulus lewisii</i> proposé par Ding et al., 2018.....	10
<b>Figure 4.</b> Schematic depiction of the phenotypic traits used in this study .....	39
<b>Figure 5.</b> Linkage map with fourteen QTLs. ....	42

## Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribo nucléique
- ADN-T : ADN de transfert
- ARN : Acide ribo nucléique
- ARNm : ARN messenger
- BLAST : *Basic Local Alignment Tool*
- cM: Centimorgan
- CRE : Élément régulateur en cis
- Evo-Devo : *Evolutionary developmental biology*, ou Biologie évolutive du développement
- ORF : *Open Reading Frame*, ou Cadre de lecture ouvert
- PVE : Proportion de la variance expliquée
- QTL : *Quantitative trait locus*, ou locus de trait quantitatif
- SNP : *Single nucleotide polymorphism*, ou polymorphisme nucléotidique
- VE : Variance expliquée



## **Remerciements**

J'aimerais en premier lieu remercier Simon Joly pour avoir cru en moi dès le tout début, et de m'avoir permis de travailler sur un projet qui correspondait en tout point à mes intérêts. Sa présence infaillible, son feedback constructif, ses connaissances inégalées de même que ses encouragements sentis ont été grandement appréciés tout au long de ma maîtrise.

Merci à mes parents pour leur support au courant de mon parcours et sans qui je ne me serais pas rendue jusqu'ici. Un grand merci aussi à mon conjoint Simon Dumas, pour son soutien inconditionnel. Il a su alléger mes épaules et remplir mon cœur.

Je tiens à remercier Sébastien Renaut, sans qui mon projet n'aurait pas pu prendre une si grande ampleur. Je le remercie pour ses suggestions et ses avis toujours réfléchis.

Je remercie aussi Daniel Kierzkowski pour ses conseils et son enthousiasme contagieux face à la recherche. Merci à Raymond Archambault pour la confiance qu'il m'a accordée et son amour de la botanique. J'aimerais aussi remercier Jocelyne Ayotte, qui m'a été d'une grande aide au laboratoire et dans ma vie professionnelle.

Un merci spécial à Andrew Blakney, qui est devenu comme un grand-frère pour moi durant mes deux ans au Centre sur la Biodiversité.

Finalement, un gros merci à mes autres amis et collègues, notamment Gabrielle Desforges, Boris Domenech, Julie Faure, Marion Leménager, Simon Morvan et Ioana Raus.

## CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

### **1.1. Constitution du mémoire**

Ce mémoire est constitué de trois chapitres. Afin de mieux situer mon projet, le premier chapitre, soit l'introduction générale, se voudra une courte revue de littérature. Celle-ci porte sur les fondements génétiques du développement floral et la morphologie de la corolle, et est divisée en trois parties. La première présentera les concepts généraux du développement floral et les modèles théoriques de sa régulation. Puis, la seconde abordera les différentes sous-caractéristiques de la forme des pétales en discutant des principaux facteurs moléculaires qui sont responsables de la modifier. Pour finir, la troisième synthétisera les différents éléments abordés dans cette revue avec une perspective plus évolutive. Pour clore l'introduction, une courte description de mon projet de maîtrise sera présentée.

Le second chapitre comporte le corps du mémoire, soit un article portant sur les bases génétiques de la variation morphologique de la corolle entre deux espèces de Gesneriacées aux modes de pollinisation différents. Ce chapitre sera soumis pour publication à la revue *Genetics*. Les auteurs sont Valérie Poulin et Simon Joly. Le premier auteur a effectué le travail de laboratoire, l'analyse des données ainsi que la rédaction du manuscrit. Simon Joly a supervisé tous les aspects du projet et a corrigé et commenté le manuscrit.

Enfin, le troisième chapitre comporte un retour sur la problématique et objectifs de mon projet, une discussion des principaux résultats obtenus, et termine avec les potentielles retombées de mes travaux et des perspectives futures.

## 1.2. Régulation génétique du développement floral

### 1.2.1. Initiation du développement floral

Lorsqu'on observe les plantes et leur développement, on peut se demander comment les différentes structures spécialisées comme les feuilles ou les fleurs se développent. Qu'est-ce qui permet le développement des fleurs et qu'est-ce qui fait qu'elles surgissent à un moment et un endroit précis? La réponse courte à cette question est qu'un changement dans l'expression de certains gènes de la plante permet de modifier le méristème apical (tissu responsable de l'élongation de la tige) en méristème floral. Cette étape est appelée l'initiation du développement floral. Cette initiation est principalement contrôlée par les gènes d'identité du méristème floral. Ceux-ci sont des facteurs de transcription qui ont surtout été étudiés chez *Arabidopsis thaliana* et *Antirrhinum majus*. Chez *A. thaliana*, les plus importants sont LEAFY (LFY), APETALA1 (AP1) puis CAULI-FLOWER (CAL) (William et al., 2004; Krizek et Fletcher, 2005). LFY a un rôle majeur puisqu'il encode un facteur de transcription qui active en amont l'expression de AP1 et de CAL. Chez *A. majus*, les principaux gènes d'identité du méristème floral sont FLORICAULA (FLO), SQUAMOSA (SQUA), ainsi que CENTRORADIALIS (CEN) qui donnerait l'identité de l'inflorescence (Egea-Cortines et al., 1999). FLO et SQUA ont respectivement un rôle apparenté à celui de LFY et de AP1 (Krizek et Fletcher, 2005). Ces gènes ont tous été bien caractérisés et ce qui en ressort est que ce sont en majorité des facteurs de transcription qui démarrent une cascade d'activation de d'autres gènes responsables entre autres de la formation des organes spécifiques aux fleurs. De plus, il est bien établi que des phytohormones telle l'auxine jouent aussi un rôle non négligeable dans la métamorphose du méristème des fleurs (Yamaguchi et al., 2013).

### 1.2.2. Modèle ABC et gènes homéotiques

Une fois le méristème floral établi, celui-ci doit se diviser en différents primordia qui donneront naissance aux organes distincts des fleurs. Cette étape majeure a bien été décrite chez *A. thaliana* en 1990 avec la publication du modèle ABC (Coen et Meyerowitz, 1991). Celui-ci stipule que les fleurs ont quatre verticilles distincts grâce à trois fonctions de gènes régulateurs (A, B et C). L'action combinée de ces gènes détermine l'identité des organes à chaque verticille : A seul donne lieu au développement des sépales (premier verticille, vers l'extérieur), A et B donnent les pétales,

B et C donnent les étamines et C seul donne les carpelles. De plus, les gènes de fonction A et C sont des antagonistes, c'est-à-dire qu'ils peuvent réprimer l'expression de l'un et de l'autre (Figure 1A, page 5). Les gènes d'identité d'organes ont été caractérisés chez *A. thaliana* et *A. majus* grâce à des mutants homéotiques, et sont pour la plupart des facteurs de transcription à domaine MADS (Theißen et al., 1996). Suite à la publication du modèle ABC, celui-ci a fait place au modèle ABCE, qui intègre une fonction D et E à la théorie précédente (Figure 1B, page 5). La fonction E est donnée par les gènes SEPALLATA1 (SEP1), SEP2, SEP3 et SEP4. Ceux-ci sont d'autres facteurs de transcription nécessaires à la distinction des organes et donnent la spécificité d'action au sein des fleurs aux autres gènes homéotiques. (Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004). La fonction D donnerait l'identité des ovules dans les tissus du carpelle.

### 1.2.3. 'Quartet model' et interaction des gènes homéotiques

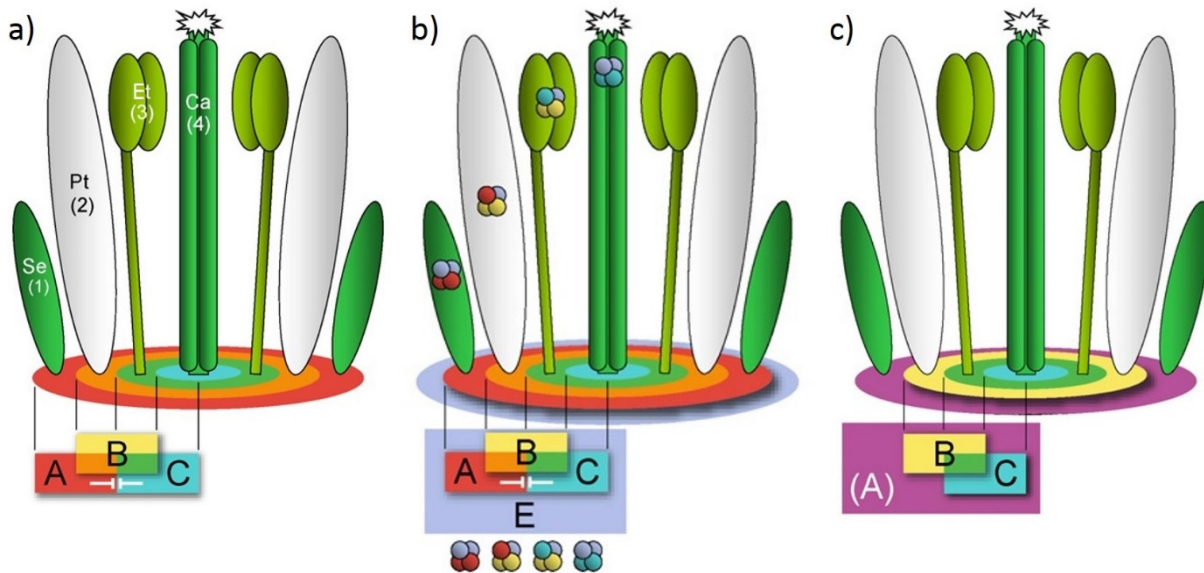
Étant donné que les gènes régulateurs de l'organogénèse sont presque tous des facteurs de transcription qui font partie de la famille à domaine MADS, ceci a mené à l'élaboration d'un modèle appelé le 'Quartet Model', qui stipule que les protéines à domaine MADS forment des tétramères qui lient l'ADN (Theißen, 2001; O'Maileidigh et al., 2014). Cette théorie explique l'action du modèle ABC : des dimères de protéines se forment selon leur classe (A, B ou C) et se joignent à eux au moins une protéine SEP pour former un tétramère. Ainsi, le « quatuor floral » est un complexe de quatre protéines liant l'ADN à des séquences consensus (CArG box). Favaro et al. (2003) puis Smaczniak et al. (2012) ont confirmé ce modèle qui démontre le mécanisme moléculaire derrière l'action combinatoire des gènes d'identité d'organes décrite dans le modèle ABC (Figure 1B, page 5).

Les gènes d'identité d'organes et les protéines qu'ils encodent ont été la cible de nombreuses études après ces découvertes. La biologie moléculaire a permis de donner des rôles particuliers et des patrons d'interaction aux facteurs de transcription. Ces données ne seront pas discutées en détail ici. Par contre, ce qui en ressort est la complexité des réseaux d'interactions des protéines, dont on était loin de se douter en regardant seulement le modèle ABC. Les facteurs de transcription découverts agissent surtout en cascade d'activations ou même en boucles d'autorégulation négative, tel est le cas pour le gène de méristème WUSCHEL (WUS) (Lenhard et al., 2001; Sun et al., 2009). Ils ont aussi parfois des doubles fonctions (répression et activation), comme pour les

gènes homéotiques de fonction B, APETALA3(AP3) et PISTILLATA (PI) (Wuest et al., 2012). D'autres protéines entrent aussi en jeu comme des facteurs remodeleurs de chromatine (Smaczniak et al., 2012).

#### 1.2.4. Point de vue évolutif et modifications du modèle ABC

L'intérêt pour l'évolution des diverses morphologies florales, surtout en ce qui a trait à la répartition des organes dans la fleur, a augmenté suite à l'accumulation de données moléculaires et à l'émergence du domaine de la biologie évolutive du développement, ou *evo-devo* (Zhang et al., 2010). En effet, ces informations sur les gènes et leur régulation ont permis à certains de se demander comment les premiers motifs floraux se sont formés et qu'est-ce qui explique les différences observées de nos jours entre espèces non modèles. D'abord, Kramer et al. (2003) ont émis l'hypothèse 'shifting boundary' (ou bordure mobile) en s'appuyant sur des monocotylédones et dicotylédones basales. Elle consiste à un glissement (vers l'intérieur ou l'extérieur) de la frontière du domaine d'expression des gènes homéotiques de fonction B par rapport au motif d'expression connu chez *A. thaliana*. C'est ainsi qu'on pourrait obtenir des tépales ou des fleurs sans pétales. Pour expliquer la morphologie des premières plantes à fleurs, un second modèle a été proposé : le modèle 'fading borders' (ou frontières en gradient) (Theissen et Melzer, 2007). Celui-ci se base toujours sur le modèle ABC, mais stipule que les gènes d'identité d'organes seraient exprimés sur toute la surface du méristème floral, avec des niveaux plus ou moins élevés pour chacun dépendamment des zones. Il n'y a donc pas de frontière clairement établie entre les organes. Ce modèle présume donc qu'il y aurait formation d'organes « hybrides », tels des staminodes ou plusieurs rangées de tépales. Il pourrait alors expliquer l'origine du modèle ABC, avant que l'établissement des frontières nettes n'ait lieu. Parallèlement, des chercheurs ont questionné la validité du modèle ABC pour des espèces non-modèles. Cela a mené à une réévaluation et la publication du modèle '(A)BC' en 2010, qui se veut plus applicable à toutes les espèces d'angiospermes (Causier et al., 2010). La fonction (A) est donnée par les gènes autrefois catégorisés comme étant de classe A et E, qui agissent ensemble pour spécifier le méristème floral et médier le bon établissement des domaines d'expression des gènes de fonction B et C, qui à eux seuls donnent l'identité aux organes (Wellmer et al., 2014). Les sépales sont ainsi considérés comme le caractère « par défaut » des fleurs (Figure 1C, page 5).



**Figure 1.** L'évolution du modèle ABC de 1990 à 2010.

A) Schéma de fleur illustrant le modèle ABC classique. Les sépales (Se) sont dans le verticille externe (1), les pétales (Pe) dans le 2<sup>e</sup> verticille, les étamines (Et) dans le 3<sup>e</sup> verticille et le carpelle (Ca) dans le verticille central (4). Les fonctions A, B et C des gènes d'identité d'organes sont indiqués dans les boîtes sous le schéma et leurs domaines d'expression sont représentés par les différentes combinaisons de couleurs. Les traits blancs entre la fonction A et C indiquent leur répression mutuelle. B) Le modèle ABCE. La fonction E (gris) donne la spécificité d'action au contexte floral aux gènes d'identité d'organes. Les facteurs à domaine MADS sont représentés par des boules aux couleurs correspondant à leur fonction, et sont agencés en différents complexes selon l'organe qu'ils spécifient, d'après le 'quartet model'. C) le modèle (A)BC. La nouvelle fonction (A) assure celle de la catégorie E précédente, en plus de réguler dans le temps et l'espace les domaines d'expression des gènes de fonction B et C. Figure modifiée de Causier et al., 2010.

### 1.3. Bases génétiques de la morphologie des pétales

#### 1.3.1. Croissance des pétales

Si on s'intéresse à la forme des pétales, il faut bien saisir l'organogénèse. C'est en effet au niveau des patrons de croissance que les différences morphologiques sont exprimées. Les facteurs majeurs responsables de la croissance des pétales et autres organes sont le nombre des cellules (division) et leur grosseur (expansion). Par rapport à la prolifération cellulaire, il faut comprendre que les cellules végétales constituant un même tissu peuvent avoir des taux de division ainsi que des plans de division différents, résultant en des patrons de croissance et proportions variés. La régulation de la prolifération cellulaire a surtout été étudiée chez *Arabidopsis thaliana*, et implique des réseaux complexes de facteurs de transcription (Powell et Lenhard, 2012), en plus nécessiter de

l'action de phytohormones telles l'auxine, le jasmonate et l'éthylène (Creelman et Mullet, 1997; Kende et Zeevaart, 1997). L'expansion cellulaire quant à elle, est déterminante pour la taille, l'orientation et la forme finale des pétales. Elle peut avoir lieu par une augmentation du volume de la vacuole qui grossit de manière isotropique, soit dans toutes les directions (Weiss et al., 2004). Par contre, l'anisotropie des cellules des pétales est fréquente puisque l'expansion est dirigée par la structure de la paroi cellulaire (Hamant et al., 2010; Braybrook et Jönsson, 2016). En effet, l'orientation des microfibrilles de cellulose constituant la paroi (elle-même guidée par les microtubules de la cellule) affecte la direction de la croissance des cellules (donc des tissus) des plantes par son aspect mécanique (Lei et al., 2014). Autrement dit, un côté plus renforcé d'une cellule va moins s'étirer par rapport aux autres, créant l'anisotropie. Par contre, il ne faut pas oublier que le tissu lui-même affecte la croissance des cellules qui le composent par de la rétroaction mécanique (Kierzkowski et Routier-Kierzkowska, 2019). Sachant cela, on peut mieux comprendre comment les primordia se développent en pétales et comment ils peuvent résulter en de structures si variées et spécialisées. Une revue portant précisément sur la régulation de la croissance des pétales (Huang et Irish, 2016) amène aussi que le schéma de croissance des pétales est en fait très semblable à celui que la plante effectue pour former des feuilles, et plusieurs gènes de régulation sont d'ailleurs en commun entre ces deux types d'organes, tel le gène JAGGED (JAG) (Schiessl et al., 2012, 2014; Sauret-Güeto et al., 2013).

### 1.3.2. Taille des pétales

La croissance des pétales a été abordée parce qu'elle affecte la forme, mais aussi la taille finale qu'atteignent les pétales. La taille des pétales à maturité est importante pour le succès reproducteur des plantes pollinisées par les animaux, et peut varier grandement. Les espèces ayant une stratégie reproductive allogame telle *A. majus* subissent une plus grande pression de sélection sur ce caractère que les fleurs autogames telle *A. thaliana*, pourtant, cette espèce demeure l'objet de plusieurs études sur la taille des organes floraux (Weiss et al., 2004). Les études qui se sont penchées sur la régulation de la taille ont découvert de nombreux facteurs ou protéines qui agissent directement sur l'expansion cellulaire. Un premier exemple est celui d'une expansine, une protéine qui promeut l'élargissement des cellules. Cette expansine spécifique aux limbes des pétales, PhEXP1, a été découverte chez *Petunia hybrida* (Zenoni et al., 2004). Elle a comme effet d'affaiblir la paroi en agissant sur la synthèse ou la déposition de cellulose durant l'expansion

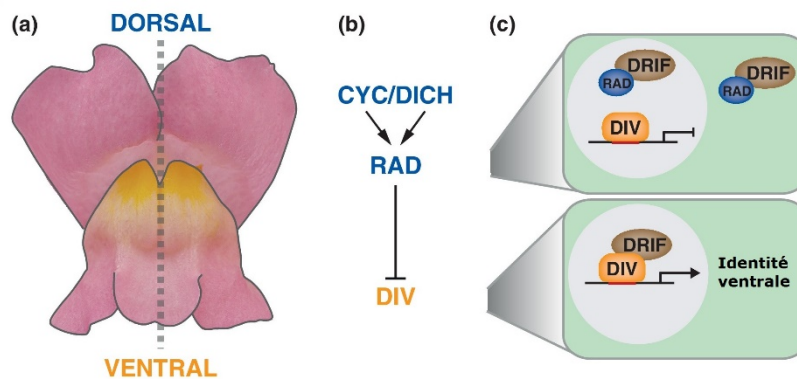
cellulaire. Un second exemple est celui d'un facteur de transcription appelé BIGPETAL (BPE). Le gène qui encode ce facteur prometteur a été découvert chez *Arabidopsis* par Szécsi et al. (2006). Celui-ci subit des événements d'épissage alternatifs, donc produit des types de transcrits exprimés partout chez la plante (BPEub) et certains spécifiques aux pétales (BPEp). Szécsi et al. ont démontré que BPEp est régulé positivement par des gènes d'identité d'organes de fonction A et B, et qu'il a comme rôle de restreindre l'expansion postmitotique. Cette découverte présente un lien entre les gènes d'identité d'organes et la morphogénèse finale des pétales, ce qui a rarement été accompli. Le troisième et dernier exemple est celui d'une protéine associée aux microtubules. Yang et al. (2019) ont récemment découvert et caractérisé la protéine INCREASED PETAL GROWTH ANISOTROPY (IPGA1) chez *A. thaliana*. Cette protéine serait en partie responsable de l'élargissement de la partie distale des pétales en régulant l'organisation des microtubules, ce qui réduit indirectement l'anisotropie. Seule la partie distale est affectée, ce qui suggère une régulation tardive du développement. Ceci démontre bien l'importance du contrôle génétique à tous les stades du développement floral.

### 1.3.3. Symétrie bilatérale

Un aspect majeur de la variété de la morphologie des fleurs est la symétrie, qui peut être radiale (actinomorphic) ou bilatérale (zygomorphic). D'un point de vue évolutif, la symétrie bilatérale serait apparue plusieurs fois indépendamment pour faciliter la pollinisation par divers animaux (Donoghue et al., 1998; Sargent, 2004; Preston et Hileman, 2009). La plupart des études concernant les bases génétiques de la symétrie florale portent sur *Antirrhinum majus*, qui est zygomorphe. Il y a plusieurs années de cela, un réseau de gènes régulateurs a été identifié. Ceux-ci agissent depuis l'initiation des organes et leur rôle majeur est de distinguer l'identité dorsale ou ventrale des pétales. Les plus importants sont CYCLOIDEA (CYC) (Luo et al., 1996), DICHOTOMA (DICH) (Luo et al., 1999), DIVARICATA (DIV) (Almeida et al., 1997) et RADIALIS (RAD) (Corley et al., 2005a). Le facteur de transcription DIV donne l'identité ventrale, qui est le caractère de base des pétales. Son expression est toutefois restreinte à l'extérieur du domaine dorsal à cause de RAD qui séquestre son cofacteur DRIF (DIV-and-RAD-interacting-factor) (Raimundo et al., 2013) (Figure 2C, page 8). Finalement, les protéines CYC et DICH sont responsables d'activer RAD dans le domaine dorsal (Figure 2B, page 8). Ce réseau d'interactions de protéines et d'ADN est simple et élégant, et il a l'avantage d'avoir quelques homologues chez



d'autres espèces à symétrie florale bilatérale et radiale. Hileman et al. (2003) ont d'ailleurs comparé l'expression des gènes *CYC* et *DICH* entre *A. majus* et *Mohavea confertiflora*, une espèce apparentée mais à symétrie radiale. Leurs recherches ont permis de démontrer que des changements de morphologie comme l'abandon d'étamines latérales ou la symétrie interne des pétales adaxiaux sont obtenus par des changements dans le domaine d'expression (étendu ou réduit) de *CYC* et *DICH*, à des stades de développement donnés. Des homologues du gène *CYC* ont aussi été étudiés chez des espèces plus éloignées, comme les *GCYC* chez les Gesneriacées (Citerne et al., 2000), les *LEGCYC* chez les Légumineuses (Cubas, 2004) et même les *GhCYC2* chez les *Gerbera* (Astéracées) (Broholm et al., 2008). Ce n'est pas un hasard si les gènes « *CYC-like* » ont été autant étudiés dans le domaine de la biologie évolutive; ce sont des facteurs de transcription de la famille des gènes *TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCP)* de classe II. Cette famille est d'un grand intérêt pour le domaine de la biologie évolutive des angiospermes puisqu'elle est entre autres lié au développement dorsal des fleurs zygomorphiques de nombreuses espèces (Busch et Zachgo, 2009; Preston et Hileman, 2009). Hileman et Cubas (2009) concluent aussi dans leur revue que des changements dans l'expression de ces gènes (spatiaux ou temporels) sont sans doute à l'origine de la diversification des morphologies florales.



**Figure 2.** Contrôle génétique de la symétrie bilatérale chez *A. majus*

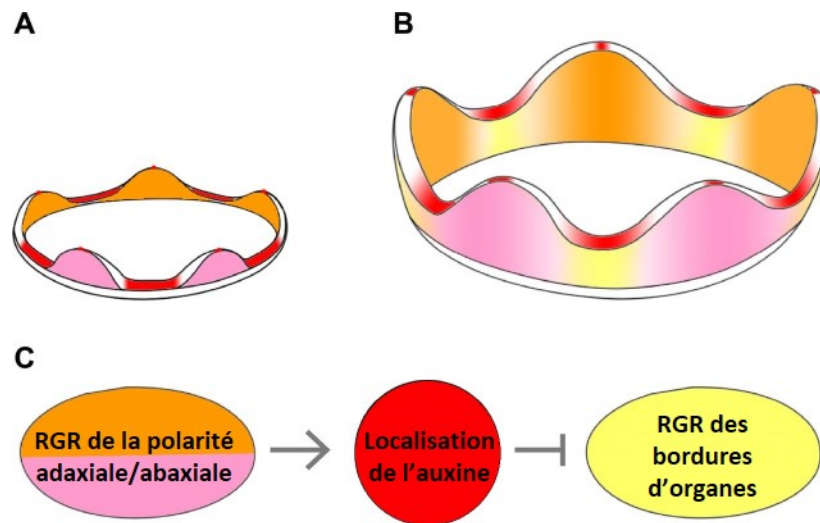
(a) Image d'une fleur d'*Antirrhinum majus* montrant les domaines dorsal et ventral et une ligne pointillée qui représente le seul axe de symétrie de la fleur. (b) Le réseau de gènes régulateurs de la symétrie bilatérale. Les gènes d'identité du domaine dorsal sont indiqués en bleu, où *CYC* et *DICH* activent *RAD*. Le gène d'identité du domaine ventral, *DIV*, est exclu du domaine dorsal par régulation négative exercée par *RAD*. (c) Schématisation de la régulation négative de *DIV* par *RAD*. Le panneau du haut représente une cellule du domaine dorsal, où *RAD*, en compétition avec *DIV*, séquestre son cofacteur *DRIF*, empêchant ainsi l'activation de gènes du développement du domaine ventral. Puisque *RAD* est absent du domaine ventral, le second panneau démontre que le complexe *DIV-DRIF* peut se former et réguler des gènes pour donner l'identité ventrale. Figure modifiée de Hileman, 2014.

L'avantage de développer des réseaux de gènes régulateurs comme celui à l'origine de la zygomorphie chez *A. majus* est qu'ils peuvent servir à la modélisation pour prédire et mieux comprendre les effets de gènes particuliers. Une étude portant sur la direction de croissance des organes floraux d'*Antirrhinum* durant leur développement (Green et al., 2010) a utilisé cette approche. En se basant sur l'action des quatre gènes de symétrie bilatérale, les taux et orientations de croissance des différentes parties de la fleur ont pu être modélisés. Grâce à cette méthode, l'équipe a pu constater que les gènes dorso-ventraux influencent directement la polarité des tissus des pétales en plus de leur vitesse de croissance. Cet article suggère alors que la modulation conjointe de ces deux aspects pourrait faire partie intégrante des mécanismes menant à l'évolution des diverses morphologies florales retrouvées aujourd'hui.

#### 1.3.4. Fusion des pétales

Mis à part la symétrie et la polarité des tissus, un autre aspect fascinant avec le développement des pétales est leur capacité à se fusionner pour former une structure tubulaire. Au même titre que la zygomorphie, la sympétalie est une adaptation importante liée à la spécialisation à divers pollinisateurs. Elle aurait évolué plusieurs fois indépendamment chez les angiospermes, et est une innovation majeure ayant contribué à la radiation du clade des Astéridés (Endress, 2011). Dans leur revue de littérature, Zhong et Preston (2015) ont d'ailleurs fait l'étude de la convergence vers ce trait au cours de l'évolution des *Asteridae*. Ce qui en ressort en premier lieu est que la sympétalie peut avoir lieu à différents moments du développement et avoir plusieurs degrés. Puisque c'est un phénomène complexe, ses bases génétiques sont encore peu connues. Un genre parmi les plus étudiés est *Petunia*, chez lequel Vandenbussche et al. (2009) ont identifié le gène MAEWEST (MAW) comme étant responsable de la fusion des pétales. Ce groupe a de plus comparé l'identité de ce gène aux gènes d'*A. thaliana* et a décrété que MAW est de la famille de facteurs de transcription WOX (WUSCHEL-related homeobox). La raison majeure responsable de la fusion des pétales est la régulation de leur polarité sur le plan adaxial/abaxial, soit le plan qui délimite la face interne et externe des pétales. Zhong et Preston (2015) amènent aussi que les quelques locus associés au développement de la fusion des pétales chez les Astéridés seraient en plus responsables de contrôler la croissance des bordures, l'expansion latérale des organes ou la production de cuticule sur les pétales libres. Par exemple, le facteur de transcription RABBIT EARS (RBE) a plusieurs fonctions dans la formation des pétales d'*A. thaliana*, dont celle de réprimer l'activité de

gènes de bordures comme les CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC) (Huang et Irish, 2016). Zhong et Preston (2015) suggèrent donc que les réseaux de régulation génétique de la croissance des organes fusionnés pourraient prendre leur origine dans les réseaux régulateurs des organes libres, en particulier des gènes de bordures pléiotropiques. Par contre, une étude récente par Ding et al. (Ding et al., 2018) amène aussi que la fusion ne devrait pas être vue simplement comme un manque de séparation. Ils stipulent que sa régulation est plus complexe. Leur étude exécutée chez *Mimulus lewisii* décrète que des petits ARN interférant à action en trans (tasiRNA) et des AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) sont impliqués dans le processus de fusion des pétales lors du développement. En effet, c'est en caractérisant leurs mutants *flayed* aux pétales séparés qu'ils ont démontré que la voie *tasiRNA-ARF* est responsable des phénotypes. Ils sont même allés jusqu'à élaborer un modèle d'action intégrant la répartition d'auxine et la polarité adaxiale/abaxiale qui explique la croissance synchronisée des primordia des pétales avec la région inter-primordia, résultant en la création d'une corolle tubulaire (Figure 3, page 10). En bref, les études récentes sur des groupes modèles comme *Mimulus* permettent d'expliquer le développement floral avec de plus en plus de précision, et ce grâce à des techniques comme la mutagenèse dirigée, des analyses de ségrégant regroupés, ou encore la modélisation.



**Figure 3.** Modèle du contrôle génétique de la formation de la corolle tubulaire chez *Mimulus lewisii* proposé par Ding et al., 2018

(A et B) Schémas de la distribution des patrons d'auxine (en rouge) à l'initiation des primordia de pétales (A) et à la formation du tube (B). La couleur orange indique le côté adaxial des pétales et la couleur rose indique le côté abaxial. La couleur jaune indique la région inter-primordia. (C) Relations génétiques entre trois modules hypothétiques. RGR: réseau de gènes régulateurs. Figure modifiée de Ding et al., 2018.

## 1.4. Perspectives

Cette revue de littérature avait comme objectif de présenter une synthèse de ce qui est présentement connu sur la génétique du développement floral, mais aussi de faire comprendre tout ce que ça implique dans la croissance et la forme des fleurs en général. De nombreux gènes ont été découverts depuis 1990 et ont permis l'élaboration de modèles de régulation et d'hypothèses quant à l'évolution des fleurs. Plusieurs données moléculaires ont été omises dans cette revue puisqu'elle porte sur un domaine d'étude très vaste. Néanmoins, il a été mentionné du contrôle génétique de tous les aspects de la morphologie florale, allant de la multiplication des cellules dans le méristème à la symétrie bilatérale en passant par l'identité des organes et la croissance directionnelle.

Lorsqu'on essaie de déceler l'action des régulateurs de l'organogénèse au niveau moléculaire, on se retrouve à décortiquer de nombreux réseaux d'interactions entre protéines et ADN. Avec le développement d'approches expérimentales permettant de caractériser ces interactions, on peut avoir de plus en plus d'informations sur les acteurs du développement floral. Or, ces données moléculaires détaillées et de plus en plus complexes sont difficilement applicables à des questionnements globaux si elles ont été obtenues chez un seul organisme modèle. Dans le même ordre d'idées, le fait que les réseaux de régulation du développement sont majoritairement issus des espèces-modèles *Arabidopsis thaliana* et *Antirrhinum majus* implique une faille majeure : ces espèces sont phylogénétiquement éloignées des espèces d'angiospermes ancestrales, mais l'évolution des plantes à fleurs est parsemée de duplications de génomes. Cela signifie que les gènes étudiés peuvent avoir évolué indépendamment et être spécifiques aux espèces-modèles, donc ne pas avoir d'homologues chez d'autres espèces, ce qui réduit drôlement l'étendue d'application de ces recherches. Chanderbali et al. (2016) proposent donc de choisir des angiospermes basales comme nouveaux organismes modèles, ainsi que de développer des 'clades-modèles' afin d'obtenir des résultats réellement probants du point de vue de la génomique évolutive ainsi que représentatifs de la diversité florale.

En ce qui concerne les données moléculaires qu'il reste à recueillir pour approfondir nos connaissances sur la régulation du développement et de la morphologie florale, cette revue a démontré qu'il serait préférable d'employer des approches pluridisciplinaires afin de maximiser et de valider l'identification de gènes et leurs actions. En effet, connaître toutes les parties des réseaux d'interactions est important pour comprendre la régulation de l'organogénèse. Pour cela, il faudrait

employer des méthodes de recherche de QTL, de génétique inverse, de transcriptomique comparative, etc. (Zhong et Preston, 2015). Un autre aspect à ne pas oublier est l'action spatio-temporelle de ces acteurs dans le développement des fleurs, puisque c'est surtout une modulation de leur expression dans le temps ou dans l'espace qui modifie la morphologie florale. Pour en prendre compte, diverses méthodes sont aujourd'hui possibles comme par exemple la modélisation mathématique, l'imagerie en temps réel de protéines dans les organes, les analyses de croissance et l'utilisation de promoteurs spécifiques à des tissus ou stades de développement (Fernandez et al., 2010; Green et al., 2010; Barbier et al., 2015; Huang et Irish, 2016). Pour terminer, les recherches futures doivent intégrer les facteurs épigénétiques et hormonaux dans l'étude de la modulation des morphologies florales, et non seulement étudier la régulation par la transcription (Wellmer et al., 2014). En somme, des parties de réseaux de gènes sont connues et démontrent du potentiel, mais d'autres parties restent à découvrir et il demeure beaucoup de travail à faire pour intégrer tous les mécanismes de régulation de la morphogénèse des fleurs ensemble afin de mieux la comprendre.

## 1.5. Description du projet

### 1.5.1. Avant-propos : l'évolution et la forme des pétales

La fleur a été une innovation majeure pour les plantes dans l'évolution. Suite à l'apparition des premières plantes à fleurs, celles-ci se sont diversifiées massivement. Cette diversification proviendrait surtout de l'adaptation des angiospermes à différents pollinisateurs (Schiestl et Johnson, 2013). En effet, certains traits qu'ont les fleurs sont associés à des types de pollinisateurs particuliers, comme la couleur, la forme, l'odeur, la quantité de nectar et même le moment de floraison (Widmer et al., 2009). Si on va plus loin, on remarque que certains de ces traits sont souvent associés, même dans des groupes taxonomiques distincts; c'est ce qu'on appelle un syndrome de pollinisation (Fenster et al., 2004). Ce regroupement de traits est présumé comme étant relativement optimal pour attirer et utiliser un groupe fonctionnel de pollinisateurs, afin d'augmenter leur succès reproducteur.

Une spécialisation des caractères floraux pour s'adapter à un type de pollinisateur a souvent été mis de l'avant comme étant un précurseur à la spéciation. Provenant originalement de Darwin, cette hypothèse selon laquelle la microévolution graduelle et l'extinction de formes transitoires mènerait à la formation de deux espèces distinctes a été confirmée chez de nombreuses espèces de plantes (van der Niet et Johnson, 2012). Dans ces cas, ce sont en grande majorité les pollinisateurs qui exercent des pressions de sélection sur les fleurs en favorisant un certain phénotype. Or, qui dit phénotype dit génotype sous-jacent. Ainsi, les gènes produisant le meilleur phénotype pour un groupe fonctionnel de pollinisateurs sont transmis dans une population, ce qui peut mener à une différenciation morphologique entre populations et éventuellement à la formation d'une nouvelle espèce.

La forme de la corolle est un caractère particulièrement touché par cette sélection, puisqu'elle peut s'ajuster à la forme de certains animaux et faciliter la pollinisation par sa symétrie ou son ouverture, attirer plus efficacement les pollinisateurs par sa grosseur, ainsi que dissuader d'autres visiteurs par son orientation et ses constriction (Castellanos et al., 2004; Sargent, 2004; Clare et al., 2013). Cependant, si on s'intéresse aux gènes sous-jacents à ces caractères, on remarque dans la littérature scientifique que sauf pour quelques espèces modèles, les processus génétiques responsables des changements dans les formes de fleur chez les angiospermes sont très peu connus.

Cela est entre autres dû au fait que la manière dont les gènes conduisent à des traits morphologiques lors du développement n'est pas toujours évidente et comprise. De surcroît, l'association que l'on peut faire entre un phénotype et les gènes à son origine est souvent laborieuse et complexe à démontrer, surtout en dehors des espèces-modèles (Yuan et al., 2013). Pourtant, ce lien est nécessaire si on veut comprendre comment les traits évoluent. C'est pourquoi dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai cherché à comprendre les bases génétiques des formes florales.

Puisque la forme des pétales est constituée de plusieurs sous-aspects qui varient tous quantitativement, une bonne manière d'étudier ses bases génétiques est la cartographie de loci de traits quantitatifs (QTL). Cette technique a l'avantage de contourner les difficultés mentionnées précédemment, puisqu'il n'est pas nécessaire de connaître les gènes de l'espèce étudiée préalablement à son utilisation, ni de produire des mutants. Seuls des croisements sont nécessaires, avec en plus la collecte de données génotypiques pour des centaines ou milliers de marqueurs (aléatoires ou non) et la mesure des caractères phénotypiques (dans ce cas-ci la forme des pétales) dans la population étudiée. La méthode de recherche des QTL consiste brièvement en l'association statistique de la variation phénotypique d'une population avec sa variation génotypique, pour un trait quantitatif donné. Ceci permet donc de localiser une ou des région(s) du génome de l'espèce (ou du groupe d'espèces) étudiée qui sont impliquées dans la variation du trait et de les placer sur une carte génétique (Mackay et al., 2009). Avec cette information, on peut d'abord avoir une idée de la complexité de la régulation du trait étudié (peu de QTL à effets forts ou beaucoup à effets faibles sur le phénotype). On peut aussi évidemment cibler ces régions pour l'étude plus précise de gènes à l'origine du phénotype, par exemple par la recherche de gènes candidats (Juenger et al., 2000) ou par la mutagenèse dirigée (Yuan et al., 2013). En bref, la cartographie des QTL est une bonne manière d'étudier les bases génétique de la forme florale, en particulier pour les espèces non-modèles (Goodwillie et al., 2006; Wessinger et al., 2014; Feng et al., 2018).

### 1.5.2. Introduction au groupe d'étude

Maintenant que les techniques de laboratoire le permettent, il est possible d'utiliser des espèces non-modèles comme sujet d'étude sur l'évolution des caractères floraux, ce qui est essentiel ne serait-ce que pour leur meilleure représentativité de la diversité écologique. Dans ce contexte, une étude génétique portant sur des organismes provenant de régions tropicales insulaires est inédit et important pour l'avancée des connaissances. Le groupe d'espèces que j'étudie témoigne de la grande biodiversité retrouvée dans les tropiques. Les *Gesneria* sont un groupe monophylétique de 67 espèces qui a vécu plusieurs événements de spéciation au cours de la Pléistocène, une ère marquée de perturbations climatiques (Hewitt, 2000). De plus, provenant des Antilles, les *Gesneria* sont un bon groupe d'étude pour les syndromes de pollinisation puisqu'elles sont isolées sur un archipel avec sensiblement la même faune pollinisatrice sur les différentes îles. Ces espèces ont d'ailleurs déjà été le sujet d'études de pollinisation (Martén-Rodríguez et Fenster, 2008; Martén-Rodríguez et al., 2009). Le premier syndrome de pollinisation qui est ressorti est celui spécialiste pour les colibris : les fleurs sont rouges-orangées, tubulaires et produisent leur nectar le jour. Le second est un syndrome spécialiste pour les chauves-souris : les fleurs sont de couleurs pâles, en forme de cloche et produisant le nectar la nuit. On retrouve de plus des syndromes généralistes chez certaines plantes du groupe; elles utilisent plusieurs types de pollinisateurs (colibris, chauve-souris et papillons de nuit) et leurs fleurs sont généralement pâles, ont une ouverture large mais une constriction à la base de la corolle (forme subcampanulée) et produisent du nectar de jour comme de nuit. On pense que l'état ancestral de ce groupe était la spécialisation pour les colibris, et qu'il y a eu au moins quatre évolutions indépendantes de la pollinisation par les chauves-souris (Martén-Rodríguez et al., 2010; Joly et al., 2018). Sachant cela, il devient intéressant d'étudier ces transitions de système de pollinisation. Heureusement, ce groupe d'espèces se prête bien aux études génétiques puisqu'elles sont diploïdes ( $n=14$ ), produisent beaucoup de graines avec un temps de germination relativement court et surtout, elles peuvent être hybridées avec des espèces distantes. Dans le cadre de mon projet, je me suis plus spécifiquement intéressée aux différences morphologiques entre les espèces *Rhytidophyllum rupincola* et *Rhytidophyllum auriculatum*. La première est une espèce spécialiste pour les colibris originaire de Cuba et la seconde est une espèce généraliste provenant de Porto Rico.



### 1.5.3. Objectifs et hypothèses de recherche

Ayant comme objectif principal d'identifier des gènes associés à la variation de la morphologie florale entre *R. rupicola* et *R. auriculatum*, je m'y suis prise en testant l'association génotype-phénotype de gènes candidats. Plus précisément, mon but était de trouver des gènes candidats pour la détermination de la forme florale dans la littérature et les bases de données et de tester l'association de ces marqueurs à la variation de la morphologie florale chez une population d'hybrides F2 (voir Alexandre *et al.*, 2015) par cartographie des QTL suivie d'analyses statistiques.

Ma première hypothèse était que les gènes associés à la variation de la morphologie florale chez mon groupe d'étude allaient être des facteurs de transcription régulant le développement floral. J'ai choisi cette hypothèse non seulement parce que les facteurs de transcription ont été le sujet de la majorité des études sur la génétique du développement floral ces dernières années, mais aussi parce que ces facteurs sont souvent recrutés lors de l'évolution d'innovations morphologiques chez les plantes (Zhang *et al.*, 2010).

Ma seconde hypothèse était que parmi mes candidats, des homologues aux gènes de symétrie bilatérale d'*A. majus* allaient être associés à au moins un QTL de la forme de la corolle. J'ai émis cette hypothèse tout d'abord parce que ces gènes de symétrie bilatérale ont été caractérisés chez *Antirrhinum*, qui est près phylogénétiquement de *Rhytidophyllum* (du moins davantage qu'*Arabidopsis*), puisqu'ils sont tous deux dans l'ordre des Lamiales. Ainsi, les gènes à l'origine de la zygomorphie des fleurs d'*A. majus* pourraient être conservés dans l'évolution et recrutés pour la zygomorphie des Gesneriacées. Ceci est appuyé par de l'évidence scientifique (Hileman et Cubas, 2009; Song *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015; Zhong et Kellogg, 2015). De plus, l'importance de ces gènes dans la régulation de la morphologie florale des Lamiales, en particulier les gènes TCP de classe II, est non négligeable (Hileman et Cubas, 2009; Song *et al.*, 2009). Par conséquent, ces gènes semblaient être des candidats très prometteurs.

## CHAPITRE 2 – UNRAVELLING GENES SHAPING COROLLA MORPHOLOGY IN THE *RHYTIDOPHYLLUM* GENUS

### **2.1. Introduction**

Character specialization is often proposed to be a driver of speciation (Schluter, 2000; Losos, 2010). Flowering plants are a group that diversified rapidly at the end of the Cretaceous period, and the adaptation to a wide range of pollinators for reproduction is thought to be a key factor in these events (Schiestl and Johnson, 2013). Indeed, for animal-pollinated species, floral adaptations to functional groups of pollinators often results in character specialization that could lead to reproductive isolation and speciation (Fenster et al., 2004; van der Niet and Johnson, 2012). Apart from reproductive isolation, pollinator-driven adaptive radiation can also be caused by diversification driven by the variation of reproductive success in a geographical pollinator mosaic (Johnson, 2006). Many floral traits can be involved in these adaptations to pollinators, such as nectar composition, color, scent, and morphology (Galliot et al., 2006; Widmer et al., 2009). Not surprisingly, many studies have shown that such traits are under strong selection pressure by pollinators (Campbell et al., 1991; Whittall and Hodges, 2007; Sapir, 2009a). However, the specific genes on which selection acts are generally unknown (but see Bradshaw and Schemske, 2003; Hoballah et al., 2007; Hopkins and Rausher, 2011).

Recently, numerous studies have shed light on the genetic and molecular basis of floral traits, contributing to our understanding of how plants adapt and speciate (Orr, 2005; Via and Hawthorne, 2005; Sapir, 2009b; Stapley et al., 2010; Rieseberg and Blackman, 2010). However, the inception and subsequent variation of these traits are often controlled by a complex network of genes, which for most part, has yet to be described for many groups (Hermann and Kuhlemeier, 2011; Huang and Irish, 2016). Indeed, it is rare to find a single gene responsible for a particular trait, due to polygenic effects, pleiotropy, epistasis, or epigenetic modifications. A useful approach to investigate the genetic bases of floral traits is to study the quantitative trait loci (QTL) responsible for a phenotype of interest. First, QTL mapping allows us to evaluate if a trait is explained by a few loci that have a large effect on the phenotypic variance, or several loci of small effect. Second, it can identify cases of pleiotropy and epistasis (Xing et al., 2002; Mackay et al., 2009; Smith, 2016). Third, it allows markers of interest, or candidate genes responsible for the trait, to be located

to specific regions by a co-segregation analysis (Juenger et al., 2000; Salvi and Tuberosa, 2005; Clare et al., 2013; Yuan et al., 2013).

QTL mapping of floral traits has been performed in *Ipomopsis* (Nakazato et al., 2013), *Iris* (Brothers et al., 2013), *Petunia* (Galliot et al., 2006; Klahre et al., 2011; Hermann et al., 2013), *Mimulus* (Lin and Ritland, 1997; Bradshaw et al., 1998; Lowry et al., 2012; Fishman et al., 2015; Ferris et al., 2017), among others (Goodwillie et al., 2006; Wessinger et al., 2014; Feng et al., 2018). Most studies on the evolution of floral traits stop after mapping the QTLs, assessing their effects on trait variation, and looking for epistasis or pleiotropy. These studies rarely try (or succeed) to find genes underlying the QTL linked to floral traits (Mackay et al., 2009). A recent example of such investigation involved an anthocyanin concentration gene in *Mimulus* (Yuan et al., 2013). This study combined different techniques with QTL mapping to obtain a valid link from gene to phenotype in the *Mimulus guttatus* and *Mimulus lewisii* species complex. The authors used near isogenic lines to be able to do fine-scale mapping of a major QTL responsible for anthocyanin concentration in the petals and locate a gene of interest within this short region. With the use of mutagenesis and transformation, they validated the role of this gene and its regulation. Unfortunately, such thorough research is not attempted frequently enough in non-model groups, likely because of the technical limitations (Stapley et al., 2010) and requirements associated with the validation step (Pflieger et al., 2001; Salvi and Tuberosa, 2005; Pardo-Diaz et al., 2015). Ultimately, selection experiments are required to evaluate the effect of individual alleles on fitness in order to demonstrate that a trait is adaptative (Garland and Rose, 2009; Pardo-Diaz et al., 2015).

One floral trait that receives less attention, despite its importance in ensuring reproductive success, is corolla shape. This structure is important for pollinator attraction and mechanical fit with the pollinator for pollen deposition, but is also involved in the deterrence of unwanted visitors (Sargent, 2004; Venail et al., 2010; Clare et al., 2013; Schiestl and Johnson, 2013). To achieve these functions, many aspects of corolla shape are subjected to variation such as size (length and width), number of petals and disposition, fusion, curvature and symmetry. The genetic basis of these corolla morphological features were investigated in a few QTL studies (Fishman et al., 2002; Goodwillie et al., 2006; Brothers et al., 2013; Nakazato et al., 2013; Wessinger et al., 2014; Ferris et al., 2017; Feng et al., 2018), which largely found that corolla shape is a complex trait with a polygenic architecture (i.e. several loci of small to moderate effects on the phenotype). However,

very few studies found genes responsible for corolla shape variation outside model species. One exception is a paper by Ding et al. (2018) that discovered that a mutation in an actin gene was responsible for a mutant phenotype causing a reduction in the corolla tube width of *Mimulus lewisii*. They also evaluated the visitation rate of pollinators (bumblebees) to account for the ecological significance of this trait. This type of study is fundamental to understanding the evolution of flower shape variation.

Although we know little of the genes involved in floral shape adaptation between species, the development of flowers has been well studied, if only in a few model organisms. The known genetic processes implicated in petal morphogenesis mostly concerns its initiation and identity in the floral meristem (Huang and Irish, 2016). For example, the well established ‘ABC model’ describe a group of B-function transcription factors responsible for petal and stamen identity in *Arabidopsis thaliana* (APETALA 3 (AP3) and PISTILLATA (PI)) and *Antirrhinum majus* (DEFICIENS (DEF) and GLOBOSA (GLO)) (Coen and Meyerowitz, 1991; Krizek and Fletcher, 2005). These flower organ identity genes were later found to have the same DNA-binding protein domain (MADS box) and to be able to dimerize and form complexes (Theißen et al., 1996). This led to the ‘Quartet Model’, which explains the combinatorial action of the organ identity genes (Theißen, 2001; Smaczniak et al., 2012). Another genetic regulation model was discovered in *A. majus*: the bilateral symmetry model (Almeida et al., 1997; Da Luo et al., 1999; Corley et al., 2005b). In this molecular network, CYCLOIDEA (CYC) and DICHOTOMA (DICH) are TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEA-PROLIFERATING CELL FACTOR (TCP) genes that give dorsal identity to the petals and activate the RADIALIS (RAD) gene. RAD is a MYB transcription factor that negatively regulates DIVARICATA (DIV) to restrain its expression in the ventral domain (Preston and Hileman, 2009). All these models were accompanied and followed by numerous molecular studies, each one adding a piece to the regulation puzzle of petal morphogenesis. Much progress has been made by looking at cellular division to understand the genetic basis of petal and flower development (Green et al., 2010; Fernandez et al., 2010; Rebocho et al., 2017; Cullen et al., 2018; Jackson et al., 2019). Indeed, the regulation in time and space of cellular division, elongation and differentiation is what gives rise to growth directionality, patterning and final corolla morphology (Kierzkowski and Routier-Kierzkowska, 2019).

While the recent genetic studies are important to acquire molecular data, refine genetic models, and understand the fine-scale genetic control of petal characteristics, they also give a restricted view of corolla shape regulation. In truth, our capacity to integrate the discovered genetic pathways together is still very limited (Wellmer et al., 2014; Ding et al., 2018), and so is the global understanding of the genetic control of petal morphogenesis.

Another shortcoming of these models is that their application across angiosperms remains unclear, or hypothetical. For example, the ‘shifting boundary’ (Kramer et al., 2003) and the ‘fading borders’ (Kim et al., 2005; Soltis et al., 2006) models represent putative modifications of the ‘ABC model’ to make it applicable to basal flowering plants. The ‘(A)BC model’ (Causier et al., 2010) was also stipulated to provide a better explanation of floral development in non-model species than the ABC and ABCE versions. Briefly, there is difficulty in understanding the evolution of the genetic processes regulating flower (and petal) development, and it comes in part from the fact that the molecular studies are mostly done on a few model species (such as *Arabidopsis thaliana* and *Antirrhinum majus*). Therefore, there is a need to study corolla shape in non-model species, perhaps by establishing model clades, as proposed by Chanderbali et al. (2016). Importantly, if we want to link the genetics of floral shape variation with its impact on plant evolution, it seems essential to study floral variation in groups where we know it had an impact on speciation.

The *Gesneriaceae* family has been the subject of many evolutionary studies (Perret et al., 2007; Roalson and Roberts, 2016; Alexandre et al., 2017). The sub-tribe *Gesneriinae* is of particular interest because it radiated into more than 80 species in the West Indies from a common ancestor (Zimmer et al., 2002; Martén-Rodríguez and Fenster, 2010) approximately 10 Ma (Roalson et al., 2008; Roalson and Roberts, 2016). These species show various pollination strategies (hummingbird, bats, moth, generalists) and there have been frequent transitions between strategies during the evolution of the group (Martén-Rodríguez et al., 2010; Joly et al., 2018) showing that pollination transitions have been an important driver of evolution for the *Gesneriinae*. *Rhytidophyllum* is a genus representative of these shifts and is well suited for genetic studies, as its species are diploids ( $n=14$ ), can hybridize with relatively distant species, and yield a large amount of seeds (Alexandre et al., 2015).

Here, we study the morphological differences between two representative species of the *Rhytidophyllum* genus: *Rhytidophyllum auriculatum* (Puerto Rico and Hispaniola) and *R.*

*rupincola* (Cuba). The first is a generalist, mostly pollinated by hummingbirds and bats, with yellow flowers that have a subcampanulate shape (bell shape with a basal constriction). The second, *R. rupincola*, is a hummingbird specialist with orange tubular flowers. We already know that the variation in morphological traits between *R. auriculatum* and *R. rupincola* is explained by a few QTLs of moderate to small effect (Alexandre et al., 2015). However, we still have no idea which genes underly these QTLs and are thus responsible for the changes in flower shape between the two typical corolla morphotypes. Hence, the goal of this study was to identify candidate genes responsible for corolla shape variation between *R. auriculatum* and *R. rupincola*. This will help to better understand how flowers adapt to their pollinators, how transitions of pollination modes occur, and how floral traits evolve.

In this study, we surveyed the literature and used a comparative transcriptomic approach to find candidate genes that could explain floral variation between *R. auriculatum* and *R. rupincola*, and tested those genes on a F2 hybrid population (Alexandre et al., 2015). Our candidate genes were genotyped in the F2 hybrids using a mass spectrometry approach (Sequenom iPLEX Gold). This genotypic data was combined with previous data to build a new linkage map and QTL mapping was done with phenotypic data for seven corolla shape traits that account for corolla shape variation between parents (Alexandre et al., 2015). We discuss in detail the genes found to co-localize with corolla shape QTLs and their potential roles in determining flower shape in *Rhytidophyllum*.

## **2.2. Material and methods**

### *2.2.1. F2 hybrid population*

Material for this study consisted of extracted DNA from *Rhytidophyllum auriculatum*, *R. rupincola*, a first-generation (F1) hybrid and 173 individuals constituting a second-generation (F2) hybrid population. To obtain F1 hybrids, *R. auriculatum* (female parent) was crossed with *R. rupincola* (male parent) from specimens from the living collection of the Montreal Botanical Garden in 2010. In 2011, an F1 individual was self-fertilized to give a F2 hybrid population. DNA was extracted in 2011 from the F2 individuals, and fresh DNA was extracted from viable parents using the Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) in 2018; all DNA samples

were kept at -20°C. See Alexandre et al. (2015) for more information about the crosses and DNA extraction.

### 2.2.2. Identifying candidate genes involved in floral variation

We used two different approaches to identify genes that could be associated with corolla shape determination in *Rhytidophyllum*. The first approach compared the transcriptomes of *R. auriculatum* and *R. rupincola* (Joly et al., n.d.) to identify genes that were potentially associated with floral development, and showed an important ratio of non-synonymous to synonymous substitutions (dN/dS). Briefly, we obtained a list of homologous transcripts between species using a reciprocal Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) approach. We then found open reading frames (ORFs) in the transcripts and estimated dN/dS ratios for all homologous transcripts using a maximum likelihood method (Yang and Nielsen, 2000) implemented by the yN00 program in the PAML package (version 4.7) (Yang, 2007). Among the ORFs containing at least 100 synonymous sites (S), we identified the transcripts with a dN/dS ratio above 1. This threshold value was set to obtain transcripts under positive selection. We then obtained the Gene Ontology information from SwissProt (UniProt Consortium, 2018) using BLAST; candidate genes were retained if one of the first 10 best SwissProt hits was associated with floral development GO terms (**Table S1**).

For the second approach, we searched the literature and Gene Ontology (Carbon et al., 2009) to find candidate genes potentially involved in floral shape. We thus searched for all the genes known to affect floral development in model species, or that were known to affect corolla or leaf shape. The main functions we were looking for were petal identity, bilateral symmetry, tissue polarity and petal growth regulation. For each candidate gene, we obtained their nucleotide or amino acid sequences in databases such as Phytozome, UniProt or GenBank (see **Table S2** for accession numbers). We then searched for homologues in our transcriptomes using BLASTn in Geneious (version 8.1.9; Biomatters, Auckland, New Zealand), using an e-value cut-off of  $1 \times 10^{-20}$ . Candidate transcripts for *R. auriculatum* (A) and *R. rupincola* (R) were also aligned and a minimum percent identity was set at 70% (74.1%). Finally, reciprocal BLASTs were done for each candidate transcript using GenBank to confirm the homology with their original candidate gene,

which was deemed valid if the gene of origin was among the top 10 results (See **Table S2** for details).

### 2.2.3. *SNP identification and validation*

In order to genotype the candidate genes identified and then map them onto a linkage map, we searched for single nucleotide polymorphisms (SNP) that could differentiate the transcripts of the two parental species, *R. auriculatum* and *R. rupicola*. Transcripts were aligned in MAFFT (version 7.164 (Kato and Standley, 2013)) for each candidate gene and SNPs were identified. We then validated these SNPs by PCR with primers designed to bind ca. 200 base pairs (bp) downstream and upstream of the SNP locations. For all the PCR reactions, the same master mix was used: 0.3  $\mu$ l of DNA (ca. 1 to 10 ng of DNA) was added to 0.75 U of Dream Taq (Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1.5  $\mu$ l of 10X Dream Taq Buffer, 0.6  $\mu$ l of each 10  $\mu$ M primers and 0.3  $\mu$ l of 10 mM dNTPs in a total reaction volume of 15  $\mu$ l. The amplification conditions were the same for all candidate genes, except for the annealing temperature (see **Table S3** for details): 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 15s, annealing at 48-54°C for 15s, elongation at 72°C for 30s, and a final extension step at 72°C for 1min. We PCR amplified 24 candidate genes from the two parental species and sequenced them using the Sanger platform at the Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Canada). The candidate gene sequences obtained were deposited in Genbank (see **Table S4** for accession numbers).

### 2.2.4. *Genotyping of the F2 hybrid population*

All candidate genes were genotyped using the Sequenom iPLEX Gold technology (Ehrich et al., 2005), which uses base-specific cleavage and mass spectrometry to genotype individuals in multiplex, by the Genome Quebec Innovation Center. For six genes, two SNPs were genotyped resulting in 6 duplicates (differentiated by the suffix “.A” or “.B” after the gene name) (Table 1).

To validate the Sequenom genotypes, we genotyped the F2 hybrid population for two candidate genes (NAC29.1 and HUA1) using PCR and enzymatic digestion. We amplified the DNA samples



from the whole population (plus the two parental species and one F1 hybrid) as described earlier (see **Table S3** for primers). A restriction site that overlap a SNP polymorphism between parent species was found using Geneious for NAC29.1. Four microliters of the PCR amplicons were thus digested with NsiI (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada) in a total reaction volume of 15  $\mu$ l according to the company's protocol and digestion products were visualized on a 1% agarose gel (See **Figure S1** for an example). Genotyping of HUA1 was performed by migrating the PCR amplicons on agarose gel (1%) as the two parental alleles already had different lengths.

### 2.2.5. Linkage map construction

To verify the association of shape traits with candidate genes by QTL mapping, we first needed to build a linkage map. This new map was built with CarthaGene (de Givry et al., 2005) using 557 Genotyping By Sequencing (GBS) markers from Alexandre et al. (2015), two candidate genes from the same study (CYCLOIDEA (CYC) and RADIALIS (RAD)), eight other markers from an unpublished study from the anthocyanin biosynthetic pathway, and the 22 candidate genes successfully genotyped in our study. This genotypic data was combined to give a matrix of 589 markers for 173 F2 hybrid individuals. Markers were divided into linkage groups with a maximum two points distance of 25 centimorgan (cM) between markers and a minimum LOD threshold of 3 using the *group* command. The *mrkdouble* and *mrkmerge* commands were used to eliminate possible double markers. After the groups were delimited, we used the *lkhd* function to order the markers in each linkage group using the 2-points distances optimization based on the Link-Kernighan heuristic algorithm. Then, for each linkage group, the best map was selected and the positions of markers in cM were obtained with the cumulative Haldane function.

### 2.2.6. Phenotypic data

In order to obtain corolla shape QTLs, we used phenotypic data for seven different morphological traits (**Figure 4**). This phenotypic data was obtained from 130 individuals among the 141 F2 hybrids that produced flowers by Alexandre et al. (2015). These seven traits consist of a combination of geometric morphometric analyses and linear measurements, obtained using four approaches. First, the morphometric variation present in the F2 hybrid population was represented

by a principal component analysis (PCA) and the first three principal components (PC) that explain 71.9% of the variance (PC1: 35%, PC2: 22.7%, PC3: 14.2%,) were used for our QTL analysis (traits 1, 2 and 3 respectively). Globally, they show how each F2 shape is different from all the morphological variability in the hybrid population. The second approach used landmarks data (geometric morphometrics) to obtain two univariate traits: corolla curvature (trait 4) and the corolla tube opening (trait 5). The third approach consisted in a PCA of morphometric data on the F2 population in addition to species of *Gesneria* and *Rhytidophyllum* with the objective of characterizing the morphological variation between the two pollination syndromes (generalist or specialist). We used the first principal component that indicates how much an individual is similar to a hummingbird specialist or to a generalist (trait 6). Finally, the fourth approach and last trait is based on a PCA of the two parents and thus represents the level of resemblance to each parent (Trait 7).

#### 2.2.7. *Quantitative trait loci detection*

QTL mapping was performed to test an association between our candidate genes and corolla shape variation. QTL mapping was done in R Studio version 3.4.3 with the R/qtl package version 1.42-8 (Broman et al., 2003). Phenotypic and genotypic data used for this study are accessible in the supplemental information. The recombination fractions between linkage groups were verified using *plotRF* function (see **Figure S2**). We also searched for potential errors with the command *calc.errorlod*, and marked the problematic genotypes (error LOD score >4) as ‘missing’ in the data before executing the QTL mapping. We finally looked for distorted segregation patterns of the markers using the function *geno.table*, that is genotypes with frequencies that departed significantly from the expected 1:2:1 ratio.

QTL mapping was done one trait at a time. Genotype probabilities were calculated every 1 cM with the function *calc.genoprob*. The probability of an association between the trait and the genotypes was calculated using the *scanone* function. The logarithm of odds (LOD) threshold above which an association was considered significant was determined with 10,000 permutations under the normal model and the Haley-Knott (hk) method. These thresholds values were calculated for alpha error thresholds of 5% and 10%. Only the sections of the linkage groups that scored higher than the LOD thresholds estimated by permutations were reported; these regions correspond

to the position of the QTL. To obtain the confidence region of the QTL, the *lodint* command was used on the linkage group with the QTL using the default interval of 1.5 (below the LOD peak). To detect minor QTLs, we did the procedure again but with the primary QTL as a covariate in the model. After the all QTLs (including minor ones) were detected for a phenotype, we used the *fitqtl* command to obtain percentage of the variance explained (PVE) by the QTLs and their associated P-values. Interaction between QTLs was not included in the model and the variance was obtained by dropping one QTL at a time from the model. Pleiotropy analyses were not performed here because a previous study using the same traits did not result in new QTLs (Alexandre et al. 2015). Similarly, epistasy analyses were not performed because no epistasy was detected for the same traits (Alexandre et al. 2015). The linkage map and QTLs positions was made with MapChart version 2.32 (Voorrips, 2002).

#### *2.2.8. Protein domain prediction and polymorphism localization*

For candidate genes that were associated with at least one shape QTL, we searched for SNPs or indels that could produce a protein-coding change between the sequences of *R. auriculatum* and *R. rupincola*. We looked for stop codons in the transcript sequences and for non-synonymous mutations in important protein domains. The domains were predicted from the transcriptome sequences by searching the CDD database using the Conserved Domains Search Service from NCBI (Marchler-Bauer et al., 2017).

### **2.3. Results**

#### *2.3.1. Twenty-nine candidate genes potentially involved in floral variation between the two species of Rhytidophyllum*

The comparative transcriptomic approach identified eight candidate genes that had a high proportion of non-synonymous substitution between species (parents) and six of them were associated with the floral development GO-term (**Table S1**). Most of these were transcription factors studied in *Arabidopsis thaliana* or *Antirrhinum majus*. The literature approach resulted in a total of 28 genes, from which we obtained 21 pairs of homologous transcripts in *R. rupincola*

and *R. auriculatum*. (**Table S2**). Some genes had more than one pair of putative homologous transcripts, in which case we considered them all as different “candidate genes” and annotated them by numbers following the gene name (ex. GRXC7.1, and GRXC7.2). We thus obtained a list of 29 candidate genes to test, 8 from the bioinformatic approach and 21 from the literature survey.

### 2.3.2. *Twenty-two candidate genes were successfully genotyped*

PCR amplification and Sanger sequencing was done on 23 candidate genes among the 29 found. Of these, 20 genes had chromatograms of sufficient quality to validate the SNPs (**Table 1**). The remaining 9 candidates that could not be amplified, or sequenced, were still kept for genotyping; the sequences and SNP positions were based only on the transcriptomes.

Thirty-seven markers were sent for genotyping by Sequenom iPLEX Gold, that is including 29 candidate genes, 6 duplicates (marked by suffix “.B”), RAD from Alexandre et al. (2015), and U73C6, a putative anthocyanin gene from an unpublished study. We obtained good genotype data for 32 of the 37 SNPs (**Table 1**). The markers that failed were CUC1, CUC2, CIN2A, DIV.2A and NAC29.2. Four more markers (two candidates and their duplicates) were eliminated because of problematic genotypic data: CYC1C.A, CYC1C.B, DIV.A and DIV.B. In the case of CYC1C.A and CYC1C.B, their SNPs were identified solely from the transcriptomic data and they were both eliminated as the SNPs did not segregate in the F2 population: all individuals scored as homozygous for the *R. auriculatum* parent (AA). The two other markers DIV.A and DIV.B were discarded because *R. auriculatum* scored as homozygous for the *R. rupicola* parent allele (RR) and because the call reliability (or quality) was rated “fair” (rates of 88.57% and 88.00%). The SNPs used for these two markers were located in introns and as such were based only on the chromatogram results. Genotypic data for all other markers had call rates ranging from 97,71% to 100%, which is considered “excellent”, except for ER (candidate gene ERECTA) that was rated “good” (see file ‘Sequenom\_locusReport.xlsx’ in the supplemental information). Furthermore, gel scoring method confirmed the Sequenom results (100%) for the candidate genes HUA1 and NAC29.1. However, the genotypes obtained by PCR (HUA1) and enzymatic digestion (NAC29.1) were used for these genes instead of the results from Sequenom because they contained fewer missing data. The last step before integrating all the genotypic data into a linkage map was to remove duplicates for the four genes for which two copies were successfully genotyped; we kept

the SNP with fewer missing genotypes: CYC.2.A , NAC54.B, PER53.A and PHAN.B (**Table 1**, supplemental file ‘Sequenom\_locusReport.xlsx’). Overall, our duplicates were proven useful to compensate for missing data or potential errors of genotyping. They also permitted us to validate the accuracy of the results, as every marker duplicate had the same genotypes for given individuals.

In summary, we obtained good genotype data for 22 candidate genes, bringing the total to 24 when including the genes RAD and CYC genotyped by Alexandre et al. (2015). The additional marker U73C6 genotyped in the Sequenom approach was also used to build the linkage map. Five of the 24 candidate genes had segregation patterns that deviated significantly from the expected 1:2:1 ratio (**Table S6**). We decided to keep these markers in our analyses as we believe the deviation was not caused by an error in genotyping, and could add valuable information to the linkage map and QTL mapping.

### *2.3.3. Linkage map and QTL mapping*

The analysis of the 589 markers with CarthaGene resulted in 16 linkage groups that were concordant with the study of Alexandre et al. (2015). Our linkage map has a total length of 1772.5 cM with an average distance between markers of 3,75 cM (**Table S5**). This is very similar to the number of chromosomes of these species of  $n=14$ .

QTL detection resulted in 11 primary and 3 minor QTLs, for a total of 14 (**Table 2, Figure 5**). The first PC (trait 1) is influenced by a QTL on LG5 that explains 17.0% of the variance and also a minor QTL on LG10 that explains 10.1% of the variance, for a total of 27.1% proportion of variance explained (PVE). Another pair of QTLs, one on LG8 and the other on LG11, explain 10.2% and 10.0%, respectively, of the variance of the second PC (trait 2), for a total of 20.2% PVE. The third PC (trait 3) is associated with one QTL on LG4 that explains 15.2% of the variance. This makes a total of 5 QTLs (with 1 minor) for the first approach.

For corolla curvature (trait 4), we detected one QTL on LG11 (11.7% VE) and two minor ones on LG5 (6.7% VE) and LG8 (6.0% VE). Together, these loci explain 24.4% of the variation in corolla curvature in the F2 population. In contrast, no significant QTLs were found for the corolla tube opening (trait 5).

The sixth trait, morphometric differences in pollination syndrome, is associated with a QTL on LG10 (12.5% VE) and another on LG5 (12.8% VE). For morphometric differences between parental shapes (trait 7), 4 QTLs were detected. They are located on LG10, LG14, LG3 and LG16 and explain 9.7%, 8.8%, 12.3% and 4.3%, respectively of the variance. The total PVE is 43.02%, the highest found in our study (**Table 2**).

We then assessed if our candidate genes were present in the QTLs identified above. We found that a total of seven candidate genes colocalized with at least one QTL (**Table 1, Figure 5**). Considering we added 24 candidate genes in the linkage map, this represents a success rate of 29.2%. The literature search for candidate genes obtained a greater success than the transcriptomic approach, where only one out of six genotyped genes colocalized with a QTL (16.7% success rate). In comparison, 16 genes from the literature search were included in the map and six of them colocalized with a QTL (31.8% success rate). The markers CYC and RAD did not colocalize with a QTL, contrasting with the results from Alexandre et al., (2015), where CYC matched with a QTL for corolla opening (trait 5).

#### 2.3.4. Protein domain predictions

In order to identify candidate SNPs that could explain the variation in corolla shape in the seven genes that colocalized with the shape QTLs, we examined the ORFs for mutations that could affect the proteins they code for. The conserved domains detected for the seven genes were all concordant with the identity of their protein of origin, further confirming their homology. No non-synonymous SNPs were detected in the conserved domains in any of the seven genes; all SNPs found were synonymous. However, we found putative insertions in two genes that could disrupt a conserved domain. The first insertion occurs in the gene DEF: a MADS-box domain immediately followed by a K-box were detected in *R. auriculatum*'s transcript sequence, however, the K-box was not detected in *R. rupicola* due to an insertion of a single nucleotide. Furthermore, the MADS-box domain was shorter in the *R. rupicola*'s transcript, due to another insertion in the 5' region of the domain. However, we did not have the genomic sequence for *R. rupicola*, so these insertions remain to be tested. The second gene with an insertion is JAGGED (JAG), where a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein domain was detected in *R. rupicola*'s sequence, whereas a 417 nucleotides insertion disrupts this domain in *R. auriculatum*. Again, only the transcriptome sequences were available

for this gene. For more information about the conserved protein domains, see **Table S8** in the supplemental information.

## **2.4. Discussion**

### *2.4.1. Comparison of methods for the research of candidate genes*

If we compare the methods used to identify putative candidate genes in the two parental species, *R. rupincola* and *R. auriculatum*, we observe that the literature search gave more positive candidates genes than the transcriptomics approach (21 vs 8). One might ask if the selection criterion of the transcriptomics approach were too strict. First, the selection criteria of ORFs with more than 100 synonymous sites to evaluate the dN/dS ratio and a criterion of  $\omega > 1$  (positive selection) may have been too strict, as it is possible that genes implicated in flower shape variation have fewer non-synonymous changes. However, lowering these criteria would have resulted in a large number of putative candidate genes, giving rise to technical limitations for the genotyping. Second, there are relatively few genes associated with floral development in the Gene Ontology database, limiting the possibility of finding genes that match our search criteria. Nevertheless, despite these restrictions, the comparative transcriptomic method allowed us to identify one candidate gene, and could represent an interesting approach to find sequences of interest in non-model species, especially when the genetic bases of a trait are not very well defined as with floral shape (Roberts and Roalson, 2017).

The literature approach managed to find 21 putative candidates. Though this approach was not exhaustive, and did not cover all possible functions related to flower development and morphology, it did allow us to find candidate genes from a two non-model plant species that would not have been possible with the transcriptome/GO-terms approach alone.

### *2.4.2. The genetics of corolla shape transition between pollination syndromes*

The number of linkage groups found (16) and their sizes range (16.8 to 190.4 cM) are concordant with the linkage map obtained by Alexandre et al. (2015). Linkage groups were not identical, but this was expected given that 30 markers (minus RAD and CYC which were included in the

previous analysis) were added in this study. This also resulted in a slightly longer map length (1772.5 compared to 1650.6 cM).

Considering all phenotypic traits, eight genomic regions were found to be involved in floral shape determination; one more than obtained by Alexandre et al. (2015). This might be due to the use of a lower LOD threshold (alpha error threshold of 10%; **Table 2**), as well as incorporating an additional 30 markers in the analyses. Still, many QTLs certainly remain to be detected as the 14 QTLs found in this study only explain a small to moderate portion of the variance of those traits (15.23% to 43.02% total variance explained for each trait).

Our results show an overrepresentation of some linkage groups associated with different shape QTLs. For example, some QTLs co-localize onto linkage group LG5, LG10, LG8 and LG11 (**Figure 5, Table 2**). In the case of LG5, QTLs of three different traits co-localize perfectly with each other and cover the whole linkage group, which is the smallest. Furthermore, when multiple QTLs are detected for a trait, the corresponding linkage groups tend to be represented together for other traits as well. For example, the first and sixth traits both have QTLs on LG5 and LG10. This is also the case for the traits 2 and 4, with QTLs on LG8 and LG11. Alexandre et al. (2015) has shown that traits 1 and 6 as well as 2 and 4 are strongly correlated, highlighting that they essentially describe the same morphological variation (**Figure 5**). As such, it is reassuring that they identified the same genomic regions. However, QTLs for different traits also sometimes colocalized in the genome, which might suggest phenotypic integration, i.e. correlated variation of traits forming a functional unit (Armbruster et al., 2014; Smith, 2016).

Compared with the previous study on the same population, our results show some QTLs associated with specific traits were lost and others gained (Alexandre et al., 2015). In other words, the number and repartition of genomic regions associated with the same seven morphological traits changed with our new linkage map. Starting with the most noteworthy differences, we did not detect any significant QTL for trait 5, whereas there was previously two QTLs on LG1 and L16 (Alexandre et al., 2015), which would have been LG5 and LG7 in the actual map. In the case of LG5, its QTL loss did not affect the number of genomic regions associated with corolla shape, as other traits mapped to the concerned region. This was not the case for LG7: with the loss of the QTL for trait 5, we lost a genome region. Even if the LOD scores on this linkage group are relatively important (peak at 3.07), they did not exceed the threshold (**Figure S3**). Interestingly, the presence of the



candidate gene CYCLOIDEA (CYC) appears to lower the LOD score. Additionally, we lost the QTL for trait 6 on the LG3 (LG14 in the previous study), but this genomic region is still detected by trait 7. It is possible that such variation in QTL detection is due to a lack of power caused by the small size of our F2 population. Conversely, we detected two QTLs for trait 4 on LG5 (QTL G, **Table 2**) and LG8 (QTL H), which are both minor QTLs accepted after the alpha threshold was increased to 10%. However, these two gains do not affect the final number of genome regions associated with corolla shape, because other QTLs were mapped onto the same regions. The same thing can be said for trait 1 detected on LG10 (QTL B). In contrast, we gained a genomic region influencing shape on LG8 that significantly explained variation in trait 2 (QTL C) and another on LG14 detected by trait 7 (QTL L). In the case of the QTL C, it is likely due to the addition of the gene GLOB that trait 2 is significantly associated in that region (**Figure S3**). Indeed, the LOD score peak (56 cM) aligns almost perfectly with the position of GLOB (57.6 cM). For the QTL L, it was clearly detected because of the cluster of new markers in LG14. In fact, 5 new markers permitted us to discover a new genomic region and a QTL. Overall, one genomic region involved in corolla shape differentiation was lost compared to Alexandre et al. (2015), whereas two were gained due to the addition of new markers. This result increases the odds that these new markers are directly involved in corolla shape determination.

Our findings imply that there are several genes involved in flower shape variation with minor to moderate effect on the phenotype. This polygenic genetic architecture for floral shape was also found in *Mimulus* (Fishman et al., 2002), *Leptosiphon* (Goodwillie et al., 2006), *Iris* (Brothers et al., 2013), *Ipomopsis* (Nakazato et al., 2013), *Penstemon* (Wessinger et al., 2014) and *Primulina* (Feng et al., 2018). Though QTL studies on flower morphology often detect many loci dispersed in the genome, each explaining a small portion of the variance (reviewed in Galliot et al., 2006; Mackay et al., 2009), this is not always the case. For instance, Bradshaw et al. (1998) found at least one QTL of large effect (PVE >25%) for the majority of flower shape traits measured (7/9) while studying differences between sympatric species *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis*. Those loci found could contain clusters of genes with large cumulative effects, or single genes of large effect, on the phenotype. Another QTL study by Ferris et al. (2017) on sympatric populations of *Mimulus guttatus* and *M. laciniatus* found 5 QTLs of large effect responsible for flower size. They explained their results by ongoing geneflow that would homogenize mutations of small effect. In our case, *Rhytidophyllum rupincola* (Cuba) and *R. auriculatum* (Hispaniola and Puerto Rico) live

in allopatry and thus cannot exchange genes in the wild, which might have given more time for genes with small effects to contribute to the corolla shape differences between the two species (Martén-Rodríguez et al., 2010).

Many things need to be considered when interpreting QTL studies such as the number of markers and the size of the mapping population, but also whether the traits studied appropriately capture all the morphological variation (Cobb et al., 2013). According to Mackay et al. (2009), an increase in marker density and sample size often results in the detection of more QTLs of smaller effects. More markers, in particular those that are likely to be associated with the trait of interest (the candidate genes), did seem to have a beneficial effect in our study. Yet, our population size is certainly too small to detect QTLs of small effect and also to precisely define the QTLs (Alexandre et al., 2015; Feng et al., 2018). Indeed, some of our QTLs are quite large (up to 66.9cM), which increases the probability that colocalization between some candidate gene and QTLs could be only caused by chance. This shows the need of candidate gene validation to verify further their association with the studied traits. Finally, perhaps other approaches to describe corolla shape, such as using 3 Dimensional models, might allow to identify new genomic regions important for flower shape (Wang et al., 2015; Hsu et al., 2017; Li-Marchetti et al., 2017). In summary, our findings show that corolla shape is most likely a complex characteristic, composed of different traits that are regulated by several genomic regions, which are sometimes linked and sometimes independent.

#### *2.4.3. Molecular and biological functions of the seven genes under corolla shape QTLs*

Few genetic studies focus on flower shape determination and variation, as it is a complex characteristic and its regulation is not yet fully understood, even in model species. Our results illustrate that the candidate gene approach is a simple and good way to acquire molecular data for non-model species, that can later be integrated with other methods in order to fully understand the evolution of flower morphology.

The seven putative genes we found under shape QTLs have homology to well-known transcription factors, including genes from *A. majus* (DEF, GLO and RAD) and *A. thaliana* (MYB16, NAC29, JAGGED (JAG) and HUA1). As these genes have been well studied, their functions in other

organisms might provide information as to their role in the determination of floral shape differentiation in *Rhytidophyllum*.

In *A. majus*, DEF and GLO are transcription factors from the MADS-box family that assume the B function, hence, the petal and stamen identity (Sommer et al., 1990; Trobner et al., 1992; Zahn et al., 2005). They have the capacity to form heterodimers and auto-regulate their own expression, though they can also be activated independently. It has been shown that the expression level of DEF and GLO differ during the developmental stages of *Antirrhinum*'s flowers, and that it could explain the progression of the petal's development (Manchado-Rojo et al., 2012). This suggests that in *Rhytidophyllum*, small differences in expression levels of DEF and GLO could be associated with variation in corolla growth and final shape, although this remains to be tested. B-function genes have been initially characterized by homeotic mutants in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*, but DEF and GLO orthologs were further characterized in *Petunia* (Zahn et al., 2005; Manchado-Rojo et al., 2012). B-function genes in *Petunia* are duplicated, and studies have shown that different copies have a more restrained domain of expression and that their interaction are more complex than in *Arabidopsis* and *Antirrhinum* (Zahn et al., 2005). In *R. auriculatum* and *R. rupincola*, only one transcriptome sequence from each species correspond to DEF and GLO, although this does not rule out the possibility to have undetected paralogs. Interestingly, the *Rhytidophyllum* putative DEF and GLO (on LG11 and LG8 respectively) were both associated to QTLs for traits 2 and 4 that are linked with variation in corolla curvature. This could suggest that their effect on the phenotype is similar, which is concordant with their redundant function described in the literature. In addition, DEF is an interesting candidate considering its single nucleotide insertion in *R. rupincola*'s sequence, disrupting a conserved protein domain that could potentially be at the origin of some of the corolla shape differences with *R. auriculatum*.

Another well described gene in *A. majus* is RAD, where it functions in bilateral symmetry by promoting the dorsal identity of flowers. The key factor that emerges from the zygomorphy genetic network is the asymmetrical expression pattern of the TCP and MYB transcription factors (bilateral symmetry genes) (Raimundo et al., 2013). Many studies have investigated this genetic network in the order Lamiales, to which *Rhytidophyllum* belongs (Hileman et al., 2003; Hileman & Cubas, 2009; Zhong & Kellogg, 2015). These bilateral symmetry genes were also studied specifically in the Gesneriaceae family (Zhou et al., 2008; Song, et al., 2009; Yang et al., 2012,

2015). In contrast to DEF and GLO, we found two putative paralogs of RAD in *Rhytidophyllum* (Alexandre et al., 2015, this study). Among the several bilateral symmetry genes tested (6 including paralogs), only one, RAD.2, is present within a QTL involved in floral morphology. This could be due to our inability to detect minor QTLs (discussed above) or because the function of these other bilateral symmetry genes is more conserved between *R. rupincola* and *R. auriculatum*. Nevertheless, RAD.2 is our most promising candidate gene, being near the peak of the highest LOD score of our 15 QTLs (QTL A, **Table 2**). Moreover, this QTL also explains the greatest proportion of variance in floral shape between the two parental species, making this gene a great candidate for future studies.

HUA1 is the only candidate gene found by the comparative transcriptomic approach that colocalized with a QTL. Interestingly, it is also the only one of the seven genes under a QTL that do not encode a transcription factor. This gene was initially characterized in *Arabidopsis thaliana* and it encodes a CCCH zinc finger RNA binding protein. It works in association with HUA2 and HEN4 to facilitate AGAMOUS (AG) pre-mRNA processing by blocking potential polyadenylation sites or promoting splicing (Chen & Meyerowitz, 1999; Li, Jia, & Chen, 2001; Cheng et al., 2003). AG is a C function organ identity gene (promotes stamens and carpels identity) in *A. thaliana* and is also required for floral determinacy in the meristem (Irish, 2010). AG is indeed central in promoting the determinate development of the floral meristem, and the timing of its regulation is even more important. The link with HUA1's function in *Rhytidophyllum*'s flower shape remains unclear, though it could affect the transition to proliferative stem cell activity in the floral meristem to the termination to form the mature flower. It would be interesting to study *Rhytidophyllum*'s AG paralog to test whether it could be responsible for flower shape differences between *R. rupincola* and *R. auriculatum*.

The remaining 3 genes grouped together under the shape QTL for trait 7 (parental differences) on LG14: NAC29.3, MYB16 and JAG. This QTL seems to be mostly involved in the position of the constriction at the base the corolla, as well as the angle at the tip of the petals (affecting the global curvature) (**Figure 4**). NAC29, also called NAP (NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI), was identified by Sablowski and Meyerowitz (1998). This transcription factor was shown to be a target gene of AP3/PI (B-function genes in *A. thaliana*), and to be involved in the transition between cell division and cell expansion in stamens and petals. Therefore, NAC29.3 is an interesting candidate

gene because the modulation of tissue growth stages could be an important factor in the determination of petal shape, especially if its expression is not uniform in the corolla area. Note that NAC29 was discovered to be a pleiotropic gene, as it has many functions in several plant process, like leaf senescence (Guo and Gan, 2006), seed morphogenesis (Kunieda et al., 2008), leaf dehydration (Zhang and Gan, 2012), chlorophyll degradation (Yang et al., 2014), among others (Olsen et al., 2005; An et al., 2018).

MYB16, which colocalized with NAC29.3, is a MIXTA-like gene present in *A. thaliana* and *A. majus* (Perez-Rodriguez, et al., 2005; Baumann et al., 2007; Dubos et al., 2010). It is an R2R3-MYB transcription factor that belongs to *A. thaliana*'s subgroup 9 (uniting *AtMYB16*, *AtMYB106*, *AmMYBML1*, *AmMYBML2* and *AmMYBML3*) (Perez-Rodriguez et al., 2005; Dubos et al., 2010). It is involved in trichome differentiation, epidermal conical cell development and overall petal morphology (Baumann et al., 2007; Li and Lu, 2014). Indeed, Baumann et al. (2007) showed that the epidermal cell morphogenesis affects the petal curvature in *Petunia hybrida* and *A. majus*. The reciprocal BLAST of the *Rhytidophyllum* transcript hit MYB106 instead of MYB16. However, *AtMYB16* and *AtMYB106* are extremely close in sequence and functionally redundant (Perez-Rodriguez et al., 2005; Baumann et al., 2007; Jaffé et al., 2007; Li and Lu, 2014). Given that *Rhytidophyllum* is evolutionary distant from *Petunia* and even more so from *Arabidopsis*, it is difficult to treat these BLAST results as conclusive, however, they certainly suggest a potential affinity in function. This MYB transcription factor could act later than NAC29 in petal development and could be indirectly responsible for variations in the petal curvature. This is consistent with the phenotypic effect of trait 7, making MYB16 an interesting candidate. As seen in the results, MYB16 is located at the exact same position on LG14 as NAC29.3. Given that their sequences are not similar, the reason why they colocalize might simply be because the genotypic data for these two markers are identical for the whole hybrid population. Note that this might not be the case if we had tested more individuals.

Also located on LG14, along with NAC29.3 and MYB16, was JAG, which encodes a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type zinc finger protein that acts as a transcription factor (repressor and activator) to control lateral organ growth and patterning in *Arabidopsis* (Ohno et al., 2004; Dinneny et al., 2004, 2006; Schiessl et al., 2014). Its mechanism of action has been unravelled piece by piece over the years. JAG was first associated with cell proliferation in leaves, sepals and petals, with an overall effect

on organ shape (Dinnyen et al., 2004; Ohno et al., 2004). Then, it was shown to work in the sepal and petal primordia to repress boundary-specifying genes, allowing normal growth (Xu et al., 2008). Later, Schiessl et al. (2012) found that JAG was responsible for the acceleration of cell division and anisotropic growth of the sepal primordia during its emergence from the meristem, and suggested that it could modulate the cell cycle by promoting the entry into S phase without having a cell volume threshold or “checkpoint”. Not only is JAG involved in the transition from meristem to primordium identity, but it also increases the growth rate in the distal region of petals during their development (Sauret-Güeto et al., 2013). Such a function, if conserved in *Rhytidophyllum*, could clearly have an impact on shape of the corolla by controlling the growth and thus the width and length of the petals. Finally, JAG’s target genes were identified by Schiessl et al. (2014) and these show a broad range of action in many floral developmental process. Additionally, JAG was shown to interact directly with AtMYB16 (Schiessl et al., 2014). In summary, JAG is a pleiotropic transcription factor that can modulate various aspects of petal development, and thus it is not surprising to see it is associated with petal shape variation in *Rhytidophyllum*. Moreover, the putative insertion in the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger domain in *R. auriculatum*’s sequence could indicate that the protein function of JAG is not conserved, potentially leading to differences in petal shape between the two species. Thus, it would be interesting to test whether this insertion in the zinc finger domain is widespread among closely related pollination generalists from the *Rhytidophyllum* genus.

The NAC29.3, MYB16, and JAG candidate genes all co-localized under a QTL for trait 7, and thus could all be involved in the determination of flower shape differences between the two *Rhytidophyllum* species. Whether they all do or simply are associated due to a hitchhiking effect remains to be determined. However, their co-localization could have an implication on the rapidity of the corolla shape transition in nature depending if the mutations along the chromosome act antagonistically or synergistically on the corolla shape.

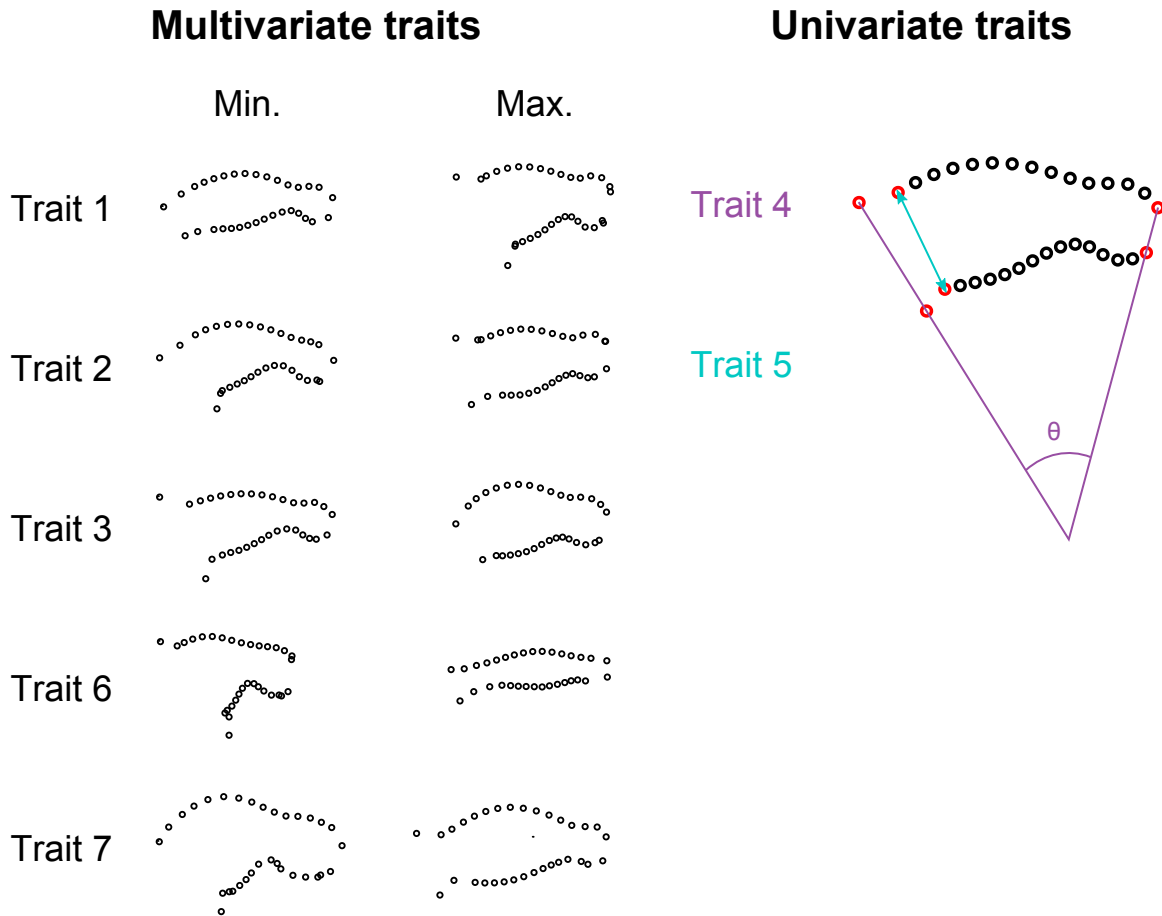
The seven candidate genes found to be associated with QTLs are all transcription factors, but they have diverse functions, acting at different times and locations in flower development. This is in line with the corolla shape being a complex trait, as many different processes are involved to produce a final petal shape. Nevertheless, the genes that emerged with the most promise and highest priority for further studies are RAD.2, NAC29.3, MYB16 and JAG. To confirm their effect

on petal shape, these candidate genes ought to be validated, either through finer mapping or transformation.

## **2.5. Conclusion**

In this study, we used a QTL mapping approach to identify genes putatively involved in corolla shape in a non-model plant. This sort of investigation is rarely undertaken, but is important to test genetic models developed in model species and to integrate developmental genetics with an evolutionary perspective (Zhang et al., 2010). More studies will be needed to confirm the identity of the genes underlying the QTL identified, but the literature search approach to identify candidate genes combined with comparative transcriptomics seems to show its utility to rapidly characterize new genes in non-model species. Eventually, future studies might confirm the genes involved in pollination syndrome transitions in *Rhytidophyllum*, which will help to explain speciation events (van der Niet and Johnson, 2012). We believe that this sort of demonstration is important to truly understand how the great floral diversity of angiosperms arose.

## 2.6. Tables and figures



**Figure 4.** Schematic depiction of the phenotypic traits used in this study

For each multivariate trait, the corolla shape variation is represented by the landmarks and semi-landmarks (black dots) of the corolla profile for the minimum and maximum value of the corresponding PCA. Under the Univariate traits is an example of measurements taken from landmarks positions (red dots).



**Table 1.** Information about the candidate genes, steps completed for each marker, and number of candidate genes left after each step

Candidate gene	Marker	Sequencing	Genotyping	Presence in linkage map	Colocalization with a QTL
CIN1	CIN1	✓	✓	✓	✗
CIN2A	CIN2A	✓	✗		
CIN	CIN	✓	✓	✓	✗
CUC1	CUC1		✗		
CUC2	CUC2		✗		
CYC.2	CYC.2.A		✓	✓	✗
	CYC.2.B		✓		
CYC1C	CYC1C.A	✗	✗		
	CYC1C.B		✗		
CYC1D	CYC1D	✓	✓	✓	✗
DEF	DEF	✗	✓	✓	✓
DIV	DIV.A	✓	✗		
	DIV.B		✗		
DIV1	DIV1	✓	✓	✓	✗
DIV.2	DIV.2	✓	✗		
ER	ERECT	✗	✓	✓	✗
EXS	EXS	✓	✓	✓	✗
GLOB	GLOB	✓	✓	✓	✓
GRXC7.1	GRXC7.1	✓	✓	✓	✗
GRXC7.2	GRXC7.2	✓	✓	✓	✗
HUA1	HUA1	✓	✓	✓	✓
IAA3	IAA3		✓	✓	✗
JAG	JAG		✓	✓	✓
MYB16	MYB16	✓	✓	✓	✓
NAC29.1	NAC29.1	✓	✓	✓	✗
NAC29.2	NAC29.2	✓	✗		
NAC29.3	NAC29.3	✓	✓	✓	✓
NAC54	NAC54.A	✓	✓		
	NAC54.B		✓	✓	✗
PER53	PER53.A	✓	✓	✓	✗
	PER53.B		✗		
PHAN	PHAN.A		✗		
	PHAN.B	✓	✓	✓	✗
PTL	PTL	✓	✓	✓	✗
RAD.2	RAD.2		✓	✓	✓
<b>29</b>	<b>35</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>7</b>

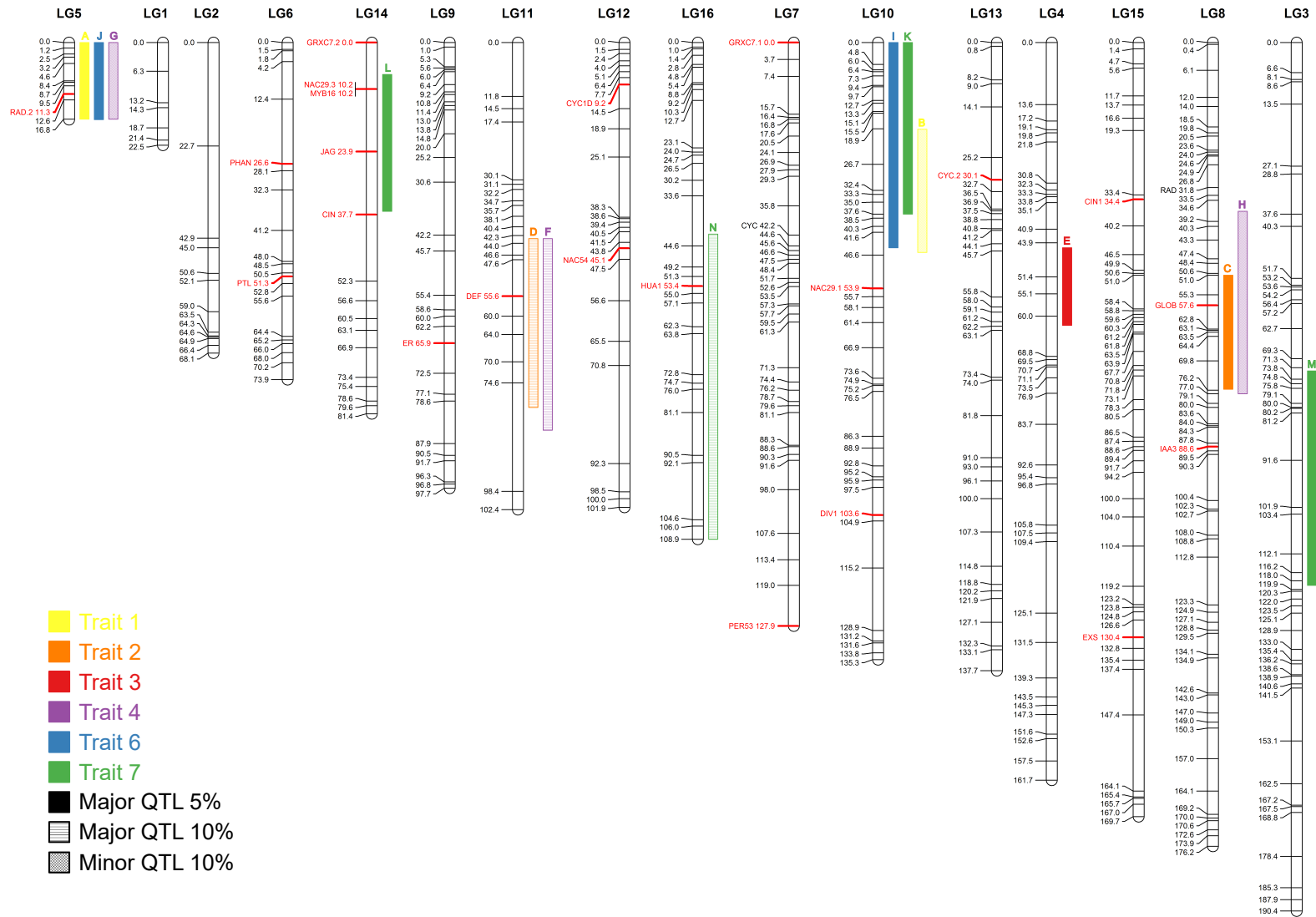
**Legend:** Green checkmark: successfully completed; Red 'X': unsuccessfully completed; Blank: not executed. The numbers at the end of each column represents the total number of genes, or of green checkmarks, at each step.

**Table 2.** Information about the fourteen QTLs identified for six traits

The letters attributed to each QTL for identification purpose are illustrated in *Figure 5*; Positions and lengths are given in centimorgan (cM) from the beginning of the linkage group; confidence regions are calculated with 1.5 LOD score decrease.

Trait number and name	QTL	Linkage group	Peak position	Confidence region	QTL length	Alpha	LOD threshold	Peak LOD score	PVE (%)	Total PVE (%)
<b>1. Variation in the hybrids: PC1</b>	A	LG5	12.6	0.0-16.8	16,8	0.05	3,8	4,92	16,97%	26,24%
	B	LG10	38	19-46	27	0.1	3,5	3,72	10,13%	
<b>2. Hybrids: PC2</b>	C	LG8	56	51-76	25	0.05	3,81	3,84	10,25%	22,81%
	D	LG11	60	43-80	37	0.1	3,48	3,76	10,00%	
<b>3. Hybrids: PC3</b>	E	LG4	51.4	45-62	17	0.05	3,88	4,63	15,23%	15,23%
<b>4. Corolla curvature</b>	F	LG11	46.6	43-85	42	0.1	3,48	3,77	11,67%	28,64%
	G	LG5	3.2	0.0-16.8	16,8	0.1	3,53	3,7	6,72%	
	H	LG8	56.0	37-77	40	0.1	3,53	3,58	5,99%	
<b>6. Syndrome differences (genus)</b>	I	LG10	29.0	0.0-45	45	0.05	3,83	3,91	12,52%	25,89%
	J	LG5	12.6	0.0-16.8	16,8	0.05	3,83	4,02	12,85%	
<b>7. Parental differences</b>	K	LG10	28	0.0-37.6	37,6	0.05	3,85	3,86	9,69%	43,02%
	L	LG14	20	7-37,0	30,00	0.05	3,85	3,97	8,83%	
	M	LG3	107	72-119	47	0.05	3,85	4,03	12,29%	
	N	LG16	91	42-108.9	66,9	0.1	3,49	3,76	4,32%	

...



**Figure 5.** Linkage map with fourteen QTLs.

The 16 LGs are disposed in length order. The 14 QTLs are represented by colored bars to the right of their designated linkage groups, with letters on top referring to *Table 2*. The patterns in QTLs bars represent different significance thresholds indicated in the legend. The 22 new markers are in red, whereas others (including *CYC* and *RAD* from Alexandre et al., 2015) are in black. Positions of markers are in cM.

## **2.7. Supplementary information**

Supplemental information including files, tables and figures are archived in figshare and are accessible via this private link:

<https://figshare.com/s/20817e151387a7d3a096>

## CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE

### **3.1. Rappel de la problématique**

Mon projet de maîtrise se situe dans un contexte où les bases génétiques déterminant la forme des pétales est mal comprise. Ceci est d'autant plus vrai chez les espèces non modèles. Non seulement il est ardu d'intégrer la panoplie de données moléculaires précises recueillies chez des organismes particuliers, mais la question de conservation de la fonction et des patrons d'interaction de gènes chez d'autres espèces est rarement résolue. C'est pourquoi il importe d'employer une multitude d'approches lorsqu'on essaie de démystifier les bases génétiques d'un caractère comme la forme de la corolle. Le domaine de la biologie évolutive du développement, ou *evo-devo*, est d'ailleurs né d'un besoin d'intégrer les fondements moléculaires du développement avec les principes d'évolution (Hoekstra et Coyne, 2007; Zhang et al., 2010). Ceci est nécessaire si on veut bien comprendre la régulation du développement des fleurs et répondre à des questionnements globaux.

Étudier un groupe d'espèces tel le genre *Rhytidophyllum* se place bien dans cette perspective. Ce groupe de Gesneriacées antillaises est très intéressant d'un point de vue évolutif, car il comporte des espèces aux syndromes de pollinisation variés. De nombreuses études ont été publiées sur l'évolution de tels syndromes chez la tribu des *Gesneria*, duquel *Rhytidophyllum* fait partie (Martén-Rodríguez et Fenster, 2008; Martén-Rodríguez et al., 2009; Martén-Rodríguez et al., 2015; Joly et al., 2018). Plusieurs questions peuvent être posées à ce sujet, à savoir si les transitions entre syndromes sont fréquentes, et combien de fois elles ont eu lieu (Martén-Rodríguez et al., 2010). Ou bien si les espèces aux syndromes spécialistes ont une plus grande pression de sélection sur la forme de leurs fleurs que les généralistes (Joly et al., 2018), et si l'apparition de ces syndromes est liée à la niche bioclimatique des espèces (Alexandre et al., 2017). Toutes ces questions évolutives et la recherche qui en découle permettent de comprendre de mieux en mieux comment progresse l'arbre de la vie. Mais qu'en est-il des mécanismes plus cryptiques comme ceux des gènes à l'origine de la diversité retrouvée aujourd'hui chez *Rhytidophyllum*? Autrement dit, sur quels gènes la sélection agit-elle lors de transitions de syndromes de pollinisation?

Une partie de la problématique associée à mon groupe d'étude est qu'étant donné que le genre *Rhytidophyllum* n'est pas un groupe modèle, on ne connaît pas le génome d'aucune espèce de ce genre. Donc pour pouvoir répondre aux questions de génétique mentionnées plus haut, les

approches classiques de biologie moléculaire (telles que la génétique directe ou inverse, ou encore la cartographie des associations pangénomiques (Nordborg et Weigel, 2008)) n'étaient pas envisageables. Néanmoins, étudier les bases génétiques de la variation de la forme florale a davantage de portée chez ce groupe que chez un organisme modèle, car cela permet de comprendre comment les transitions de modes de pollinisation ont lieu. Ce contexte évolutif est important, surtout face aux potentiels changements dans les populations de pollinisateurs causés par les changements climatiques (Burkle et Alarcón, 2011; CaraDonna et al., 2017; Levin, 2019).

### **3.2. Retour sur les objectifs et hypothèses**

Lors de mon projet de maîtrise, j'avais comme objectif de trouver des gènes associés à la variation de la forme de la corolle entre *Rhytidophyllum auriculatum* et *Rhytidophyllum rupincola*. Pour atteindre cet objectif, j'ai utilisé une combinaison de recherche de gènes candidats et de cartographie de QTLs. Ma recherche dans la littérature m'a permis de trouver vingt-et-un gènes potentiellement impliqués dans la détermination de la forme des pétales, auxquels se sont ajoutés huit gènes issus de l'approche de transcriptomique comparative. De ces vingt-neuf gènes, vingt-deux ont passé avec succès les étapes d'amplification, de séquençage, de génotypage et d'intégration à la carte génétique, soit seize issus de la recherche dans la littérature et six de l'approche de transcriptomique. Parmi les vingt-deux gènes candidats cartographiés, sept sont placés sous un QTL expliquant une partie de la variation florale de la population d'hybrides de seconde génération. Ainsi, mon objectif a été atteint, puisque j'ai pu identifier sept gènes d'intérêt influençant potentiellement la forme des pétales chez *R. auriculatum* et *R. rupincola*.

Ma première hypothèse, qui stipulait que les gènes trouvés allaient coder pour des facteurs de transcription, s'est avérée vraie pour six des sept gènes candidats. Le septième gène, HUA1 code en fait pour une protéine qui lie l'ARNm du gène AGAMOUS (AG) pour compléter sa maturation (sans doute par l'épissage des introns) (Cheng et al., 2003). Il n'en demeure pas moins que les sept gènes trouvés sont tous impliqués dans la régulation d'autres gènes, que ce soit avant ou après leur transcription en ARNm. Ceci n'est pas surprenant, étant donné que l'importance de la régulation des gènes dans l'évolution de la variation morphologique est vastement acceptée par le domaine de l'*evo-devo* (Carroll, 2000, 2005; Hoekstra et Coyne, 2007). Par régulation, il est question ici de tout type de contrôle de l'expression de gènes dans le temps et dans l'espace. Cette régulation peut

être effectuée entre autres par des promoteurs, par des éléments régulateurs en cis (CREs), soit des courts morceaux d'ADN non codants qui contrôlent l'expression d'un gène sur le même brin d'ADN, ou encore par des facteurs de transcription. Dans leur revue, Zhang et al. (2010) montrent d'ailleurs que l'évolution d'innovations morphologiques chez les plantes prend souvent origine dans le recrutement de facteurs de transcription préexistants pour produire une différente fonction. Par ailleurs, la proportion élevée de facteurs de transcription dans ma liste de candidats était due au fait que les gènes identifiés dans la littérature sont pour la plupart des facteurs de transcription. Ce n'était pas un biais de sélection de ma part lors de mon choix de gènes candidats. Ma stratégie était plutôt de tester le plus de gènes possibles pour permettre d'identifier les principaux gènes associés à la forme des pétales chez *Rhytidophyllum*.

Dans ma seconde hypothèse, je supposais que j'allais trouver des gènes de la symétrie bilatérale associés à au moins un QTL. Au final, elle s'est avérée vraie pour seulement un gène parmi les six testés : RAD.2. En d'autres mots, les candidats CYC.2, CYC1D, DIV1, RAD et CYC ne se retrouvent pas sous un QTL associé à la variation morphologique de *Rhytidophyllum*. Les principales raisons qui pourraient expliquer cela ont été discutées au chapitre 2. Ce résultat demeure néanmoins encourageant, puisque RAD.2 est fortement associé au QTL A sur le LG5 et il est un de nos candidats les plus prometteur pour des études futures.

### **3.3. Critique des résultats**

#### *3.3.1. Sept gènes parmi 29 candidats*

Certains pourraient dire que sept gènes localisés sous les QTLs de la forme parmi vingt-neuf candidats, c'est peu. Il pourrait avoir de nombreuses raisons pour expliquer un si faible taux de succès (24,14%), entre autres que la majorité des séquences utilisées comme candidates provenaient d'*Arabidopsis thaliana*, qui est phylogénétiquement distante de notre groupe. En fait, j'ai choisi de conserver ces séquences premièrement parce qu'elles avaient la meilleure évidence de leur implication dans la forme des pétales, puisque *A. thaliana* est une espèce modèle. Deuxièmement, parce que j'avais confiance en l'homologie des séquences, comme elles ont été validées par BLAST réciproque. Troisièmement, parce que ma stratégie était de maximiser mes chances d'identifier des gènes, sachant que plusieurs pourraient être éliminés au cours du

processus. Une autre raison pour laquelle certains candidats prometteurs ne se sont appariés avec aucun QTL est que plusieurs gènes du développement floral ont subi des duplications de génome et potentiellement une perte de fonction (Theißen et al., 1996; Martín-Trillo et Cubas, 2010; Chanderbali et al., 2016). Cela pourrait expliquer pourquoi j'ai parfois trouvé différentes copies du même gène et pourquoi un seul d'entre eux est sous un QTL. Du même raisonnement découle aussi le fait que j'ai pu avoir raté la bonne copie d'un gène prometteur dans ma recherche de candidats. Il est aussi à noter que les gènes candidats qui ne sont pas localisés sous un QTL ne sont pas nécessairement dissociés de la variation morphologique des pétales, considérant que des QTL mineurs demeurent indétectés. Dans un autre ordre d'idées, l'absence de colocalisation de vingt-deux gènes candidats avec les QTLs pourrait être expliquée par le fait que plusieurs de ces candidats sont des gènes du développement floral qui pourraient être indispensables à la plante. En effet, leurs séquences pourraient être conservées entre *R. auriculatum* et *R. rupincola*, puisque des modifications pourraient entraîner des failles majeures dans le développement de leurs fleurs, plutôt que des fines variations morphologiques dans leurs pétales. Finalement, l'absence d'implication de certains gènes du développement floral dans la variation morphologique de mon groupe d'étude ne signifie pas que ces gènes ne pourraient pas être impliqués chez d'autres espèces similaires (Smith et al., 2004; Zhou et al., 2008; Yang et al., 2015; Hsu et al., 2017). Autrement dit, comme plusieurs combinaisons de gènes sont impliquées dans la modification de traits floraux, il est aussi possible que différents gènes expliquent les mêmes variations morphologiques pour différentes espèces. Par exemple, l'élargissement de l'ouverture de la corolle pour permettre la pollinisation par des chauves-souris a pu évoluer indépendamment chez les espèces généralistes du groupe *Gesneria* par le recrutement de différents gènes. Cette hypothèse serait intéressante à tester, surtout pour des facteurs de transcriptions issus de duplications de génome historiques.

### 3.3.2. Caractérisation des sept gènes et polymorphismes

La fonction des sept gènes a été élaborée en détails dans le chapitre 2 de ce mémoire et ne sera pas discutée d'avantage ici. Par contre, quant à la structure et aux polymorphismes entre les séquences de *R. auriculatum* et *R. rupincola*, on remarque que deux des sept gènes ont des insertions qui perturbent la séquence d'un domaine fonctionnel pour une des deux espèces. Comme discuté plus haut, ceci pourrait engendrer des différences morphologiques entre les deux espèces. Néanmoins,



ce qui ressort aussi de ces résultats est que parmi les nombreux SNPs localisés dans des domaines fonctionnels de protéines codées par les cinq autres gènes, aucun d'entre eux n'est non-synonyme. Autrement dit, il n'y a aucune mutation dans ces domaines qui changerait l'identité d'un acide aminé (appelée aussi mutation de structure). Que se passe-t-il donc avec ces cinq gènes pour qu'ils soient responsables de différences morphologiques entre *R. auriculatum* et *R. rupicola*? Pour le savoir, il faudrait sans doute quantifier leur expression (Roberts et Roalson, 2017) et étudier de plus près leurs protéines. Par contre, la biologie évolutive du développement amène aussi une piste de réflexion quant à l'origine de la diversité morphologique des plantes: des changements dans l'expression de gènes sont plus souvent causés par un changement dans la séquence de leur promoteur ou des éléments régulateurs en cis (CREs) qui le composent plutôt que par une modification d'un facteur de transcription (Della Pina et al., 2014). Ceci s'explique en partie par le fait que les facteurs de transcription ont souvent plusieurs gènes comme cibles. Ainsi, une mutation délétère dans un de ces facteurs peut avoir des effets pléiotropiques, ce qui peut être contre-sélectionné, en particulier si ces effets « secondaires » sont désavantageux pour le succès reproducteur de la plante. Autrement dit, les mutations dans les CREs sont davantage conservées et propagées dans une population parce qu'elles permettent d'acquérir de nouvelles fonctions tout en minimisant les effets pléiotropiques (Carroll, 2005; Della Pina et al., 2014). Par contre, il est hasardeux d'étudier ces CREs parce qu'ils sont difficiles à reconnaître et parfois localisés dans des introns à plusieurs kilobases de distance du gène qu'il affecte. Il est aussi à noter que l'importance relative des CREs dans l'évolution du développement des plantes est controversée (Hoekstra et Coyne, 2007; Yuan et al., 2013).

### **3.4. Perspectives**

Dans ce mémoire, j'ai pu démontrer que la recherche de gènes candidats par revue de littérature accompagnée de transcriptomique comparative est efficace pour repérer des gènes d'intérêt chez des espèces de plantes dont le génome n'est pas séquencé. De plus, comme la forme de la corolle est généralement un trait complexe et polygénique (Fishman et al., 2002; Goodwillie et al., 2006; Wessinger et al., 2014), la cartographie des QTL s'est avérée être une bonne technique pour localiser les régions de génomes impliquées dans la détermination de diverses formes florales. La variation de la morphologie florale, entre espèces ou au sein d'une population, est un caractère des

plus importants pour comprendre comment les plantes s'adaptent à leurs pollinisateurs et comment elles se diversifient (van der Niet et Johnson, 2012). Ainsi, les méthodes employées au cours de ce projet permettent de répondre efficacement (et de manière peu dispendieuse) à des enjeux bien actuels.

Une des principales avenues qui pourrait faire suite à mes travaux serait de valider l'effet des sept gènes que j'ai identifiés sur le phénotype de *R. auriculatum* et *R. rupicola* par l'entremise de la transformation génétique. En effet, ce processus de génétique inverse consiste à produire des mutants sans expression du gène d'intérêt (*knockout*), avec expression réduite (*knockdown*), ou expression augmentée par l'entremise de l'insertion d'ADN-T dans le génome de la plante par une bactérie comme *Agrobacterium tumefaciens* (Gilchrist et Haughn, 2010). La validation de l'implication des sept gènes d'intérêt dans la forme de la corolle pourrait donc se faire hypothétiquement en mesurant l'effet sur le phénotype du retrait d'un de ces gènes chez l'une ou l'autre des espèces étudiées, ou en mesurant l'effet de la substitution de l'allèle de *R. auriculatum* par celui de *R. rupicola* par exemple. Par contre, la production de transgéniques n'a pas encore été tentée chez *Rhytidophyllum*, donc sa faisabilité demeure un mystère. Toutefois, des protocoles de micropropagation, de régénération et de transfection par *A. tumefaciens* ont été développés chez certaines Gesneriacées, notamment la violette africaine, ou *Saintpaulia ionantha* (Mercuri et al., 2000), *Ramonda myconi* (Tóth et al., 2004, 2005), *Sinningia speciosa* (Zhang et al., 2008; Kuo et al., 2018), et *Chirita pumila* (Liu et al., 2014), donnant de l'espoir pour *Rhytidophyllum*. Une autre avenue connexe, si la transformation s'avère impossible chez les espèces de *Rhytidophyllum*, serait de cloner les sept gènes d'intérêt chez une espèce modèle comme *Mimulus guttatus* ou *Antirrhinum majus*. Ainsi, un effet sur la forme des fleurs de ces espèces suite à une insertion d'un gène de *Rhytidophyllum* pourrait être une indication de la fonction réelle du gène. Additionnellement, une expérience de sauvetage (*rescue experiment*) (knockout du gène d'origine et remplacement par la version du gène d'une espèce de *Rhytidophyllum*) pourrait réellement démontrer la fonction du gène d'intérêt (Yuan et al., 2013).

Pour conclure, sept gènes liés à la forme de la corolle chez *Rhytidophyllum* est un grand nombre, considérant que pratiquement aucun gène n'était connu chez ce groupe auparavant. Cela représente une avancée importante dans le développement des connaissances sur la génétique de la forme florale, en particulier pour des espèces de plantes non-modèles. Je suis fière d'avoir pu faire partie

de ce projet et d'avoir pu contribuer à l'identification de ces sept gènes d'intérêt. L'implication potentielle de ces gènes dans les transitions de modes de pollinisation d'espèces de Gesneriacées Antillaises et dans leur diversification donne une signification évolutive à mes travaux, ce qui est rarement vu dans les études de biologie moléculaire. Ce contexte évolutif est primordial pour avoir une vue d'ensemble sur la régulation de la morphologie florale. En somme, bien que ce mémoire ait permis de clarifier les bases génétiques de la forme des pétales, beaucoup de travail reste encore à faire pour en comprendre tous les détails. Pour y arriver, il est nécessaire d'employer des approches pluridisciplinaires et d'étudier une plus grande diversité d'espèces.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alexandre, H., J. Faure, S. Ginzburg, J. Clark, and S. Joly. 2017. Bioclimatic niches are conserved and unrelated to pollination syndromes in Antillean Gesneriaceae. *Royal Society Open Science* 4: 170293.
- Alexandre, H., J. Vrignaud, B. Mangin, and S. Joly. 2015. Genetic architecture of pollination syndrome transition between hummingbird-specialist and generalist species in the genus *Rhytidophyllum* (Gesneriaceae). *PeerJ* 3: e1028.
- Almeida, J., M. Rocheta, and L. Galego. 1997. Genetic control of flower shape in *Antirrhinum majus*. *Development* 124: 1387–1392.
- An, J.-P., R. Li, F.-J. Qu, C.-X. You, X.-F. Wang, and Y.-J. Hao. 2018. An apple NAC transcription factor negatively regulates cold tolerance via CBF-dependent pathway. *Journal of Plant Physiology* 221: 74–80.
- Armbruster, W. S., C. Pélabon, G. H. Bolstad, and T. F. Hansen. 2014. Integrated phenotypes: understanding trait covariation in plants and animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369: 20130245–20130245.
- Barbier, P. de R., A. L. Routier-Kierzkowska, D. Kierzkowski, G. W. Bassel, T. Schüpbach, G. Tauriello, N. Bajpai, et al. 2015. MorphoGraphX: A platform for quantifying morphogenesis in 4D. *eLife* 4: 05864–05864.
- Baumann, K., M. Perez-Rodriguez, D. Bradley, J. Venail, P. Bailey, H. Jin, R. Koes, et al. 2007. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors. *Development* 134: 1691–1701.
- Bradshaw, H. D., K. G. Otto, B. E. Frewen, J. K. McKay, and D. W. Schemske. 1998. Quantitative Trait Loci Affecting Differences in Floral Morphology Between Two Species of Monkeyflower (*Mimulus*). *Genetics* 149: 367–382.
- Bradshaw, H. D., and D. W. Schemske. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426: 176.
- Braybrook, S. A., and H. Jönsson. 2016. Shifting foundations: the mechanical cell wall and development. *Current Opinion in Plant Biology* 29: 115–120.
- Broholm, S. K., S. Tähtiharju, R. A. E. Laitinen, V. A. Albert, T. H. Teeri, and P. Elomaa. 2008. A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 9117–9122.
- Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889–890.

- Brothers, A. N., J. G. Barb, E. S. Ballerini, D. W. Drury, S. J. Knapp, and M. L. Arnold. 2013. Genetic Architecture of Floral Traits in *Iris hexagona* and *Iris fulva*. *Journal of Heredity* 104: 853–861.
- Burkle, L. A., and R. Alarcón. 2011. The future of plant–pollinator diversity: Understanding interaction networks across time, space, and global change. *American Journal of Botany* 98: 528–538.
- Busch, A., and S. Zachgo. 2009. Flower symmetry evolution: towards understanding the abominable mystery of angiosperm radiation. *BioEssays* 31: 1181–1190.
- Campbell, D. R., N. M. Waser, M. V. Price, E. A. Lynch, and R. J. Mitchell. 1991. Components of Phenotypic Selection: Pollen Export and Flower Corolla Width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 45: 1458–1467.
- CaraDonna, P. J., W. K. Petry, R. M. Brennan, J. L. Cunningham, J. L. Bronstein, N. M. Waser, and N. J. Sanders. 2017. Interaction rewiring and the rapid turnover of plant–pollinator networks. *Ecology Letters* 20: 385–394.
- Carbon, S., A. Ireland, C. J. Mungall, S. Shu, B. Marshall, and S. Lewis. 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25: 288–289.
- Carroll, S. B. 2000. Endless Forms: The Evolution of Gene Regulation and Morphological Diversity. *Cell* 101: 577–580.
- Carroll, S. B. 2005. Evolution at Two Levels: On Genes and Form. *PLOS Biology* 3: e245.
- Castellanos, M. C., P. Wilson, and J. D. Thomson. 2004. ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 876–885.
- Causier, B., Z. Schwarz-Sommer, and B. Davies. 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21: 73–79.
- Chanderbali, A. S., B. A. Berger, D. G. Howarth, P. S. Soltis, and D. E. Soltis. 2016. Evolving Ideas on the Origin and Evolution of Flowers: New Perspectives in the Genomic Era. *Genetics* 202: 1255–1265.
- Chen, X., and E. M. Meyerowitz. 1999. HUA1 and HUA2 Are Two Members of the Floral Homeotic AGAMOUS Pathway. *Molecular Cell* 3: 349–360.
- Cheng, Y., N. Kato, W. Wang, J. Li, and X. Chen. 2003. Two RNA Binding Proteins, HEN4 and HUA1, Act in the Processing of AGAMOUS Pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell* 4: 53–66.
- Citerne, H. L., M. Möller, and Q. C. B. Cronk. 2000. Diversity of cycloidea -like Genes in Gesneriaceae in Relation to Floral Symmetry. *Annals of Botany* 86: 167–176.

- Clare, E. L., F. P. Schiestl, A. R. Leitch, and L. Chittka. 2013. The promise of genomics in the study of plant-pollinator interactions. *Genome Biology* 14: 207.
- Cobb, J. N., G. DeClerck, A. Greenberg, R. Clark, and S. McCouch. 2013. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 867–887.
- Coen, E. S., and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37.
- Corley, S. B., R. Carpenter, L. Copsey, and E. Coen. 2005a. Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5068–5073.
- Corley, S. B., R. Carpenter, L. Copsey, and E. Coen. 2005b. Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 5068–5073.
- Creelman, R. A., and J. E. Mullet. 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *The Plant Cell* 9: 1211–1223.
- Cubas, P. 2004. Floral zygomorphy, the recurring evolution of a successful trait. *BioEssays* 26: 1175–1184.
- Cullen, E., M. Fernández-Mazuecos, and B. J. Glover. 2018. Evolution of nectar spur length in a clade of *Linaria* reflects changes in cell division rather than in cell expansion. *Annals of Botany* 122: 801–809.
- Da Luo, R. Carpenter, L. Copsey, C. Vincent, J. Clark, and E. Coen. 1999. Control of Organ Asymmetry in Flowers of *Antirrhinum*. *Cell* 99: 367–376.
- Della Pina, S., E. Souer, and R. Koes. 2014. Arguments in the evo-devo debate: say it with flowers! *Journal of Experimental Botany* 65: 2231–2242.
- Ding, B., R. Xia, Q. Lin, V. Gurung, J. M. Sagawa, L. E. Stanley, M. Strobel, et al. 2018. Developmental genetics of corolla tube formation: role of the tasiRNA-ARF pathway and a conceptual model. *bioRxiv*: 253112.
- Dinneny, J. R., D. Weigel, and M. F. Yanofsky. 2006. NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* 133: 1645–1655.
- Dinneny, J. R., R. Yadegari, R. L. Fischer, M. F. Yanofsky, and D. Weigel. 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* 131: 1101–1110.

- Ditta, G., A. Pinyopich, P. Robles, S. Pelaz, and M. F. Yanofsky. 2004. The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Current Biology* 14: 1935–1940.
- Donoghue, M. J., R. H. Ree, and D. A. Baum. 1998. Phylogeny and the evolution of flower symmetry in the Asteridae. *Trends in Plant Science* 3: 311–317.
- Dubos, C., R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin, and L. Lepiniec. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15: 573–581.
- Egea-Cortines, M., H. Saedler, and H. Sommer. 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal* 18: 5370–5379.
- Ehrich, M., S. Böcker, and D. van den Boom. 2005. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Research* 33: e38–e38.
- Endress, P. K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American journal of botany* 98: 370–396.
- Favaro, R., A. Pinyopich, R. Battaglia, M. Kooiker, L. Borghi, G. Ditta, M. F. Yanofsky, et al. 2003. MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 2603–2611.
- Feng, C., C. Feng, L. Yang, M. Kang, and M. D. Rausher. 2018. Genetic architecture of quantitative flower and leaf traits in a pair of sympatric sister species of *Primulina*. *Heredity*: 1.
- Fenster, C. B., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, and J. D. Thomson. 2004. Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 375–403.
- Fernandez, R., P. Das, V. Mirabet, E. Moscardi, J. Traas, J.-L. Verdeil, G. Malandain, and C. Godin. 2010. Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nature Methods* 7: 547–553.
- Ferris, K. G., L. L. Barnett, B. K. Blackman, and J. H. Willis. 2017. The genetic architecture of local adaptation and reproductive isolation in sympatry within the *Mimulus guttatus* species complex. *Molecular Ecology* 26: 208–224.
- Fishman, L., P. M. Beardsley, A. Stathos, C. F. Williams, and J. P. Hill. 2015. The genetic architecture of traits associated with the evolution of self-pollination in *Mimulus*. *New Phytologist* 205: 907–917.
- Fishman, L., A. J. Kelly, and J. H. Willis. 2002. Minor Quantitative Trait Loci Underlie Floral Traits Associated with Mating System Divergence in *Mimulus*. *Evolution* 56: 2138–2155.

- Galliot, C., J. Stuurman, and C. Kuhlemeier. 2006. The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 78–82.
- Garland, T., and M. R. Rose. 2009. *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*. University of California Press.
- Gilchrist, E., and G. Haughn. 2010. Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants. *Briefings in Functional Genomics* 9: 103–110.
- de Givry, S., M. Bouchez, P. Chabrier, D. Milan, and T. Schiex. 2005. Cartha Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703–1704.
- Goodwillie, C., C. Ritland, and K. Ritland. 2006. The Genetic Basis of Floral Traits Associated with Mating System Evolution in *Leptosiphon* (polemoniaceae): An Analysis of Quantitative Trait Loci. *Evolution* 60: 491–504.
- Green, A. A., J. R. Kennaway, A. I. Hanna, J. A. Bangham, and E. Coen. 2010. Genetic Control of Organ Shape and Tissue Polarity. *PLOS Biology* 8: e1000537.
- Guo, Y., and S. Gan. 2006. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* 46: 601–612.
- Hamant, O., J. Traas, and A. Boudaoud. 2010. Regulation of shape and patterning in plant development. *Current Opinion in Genetics & Development* 20: 454–459.
- Hermann, K., U. Klahre, M. Moser, H. Sheehan, T. Mandel, and C. Kuhlemeier. 2013. Tight Genetic Linkage of Prezygotic Barrier Loci Creates a Multifunctional Speciation Island in *Petunia*. *Current Biology* 23: 873–877.
- Hermann, K., and C. Kuhlemeier. 2011. The genetic architecture of natural variation in flower morphology. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 60–65.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907.
- Hileman, L. C. 2014. Bilateral flower symmetry—how, when and why? *Current Opinion in Plant Biology* 17: 146–152.
- Hileman, L. C., and P. Cubas. 2009. An expanded evolutionary role for flower symmetry genes. *Journal of Biology* 8: 90.
- Hileman, L. C., E. M. Kramer, and D. A. Baum. 2003. Differential regulation of symmetry genes and the evolution of floral morphologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 12814–12819.
- Hoballah, M. E., T. Gübitz, J. Stuurman, L. Broger, M. Barone, T. Mandel, A. Dell’Olivo, et al. 2007. Single Gene–Mediated Shift in Pollinator Attraction in *Petunia*. *The Plant Cell* 19: 779–790.



- Hoekstra, H. E., and J. A. Coyne. 2007. The Locus of Evolution: Evo Devo and the Genetics of Adaptation. *Evolution* 61: 995–1016.
- Hopkins, R., and M. D. Rausher. 2011. Identification of two genes causing reinforcement in the Texas wildflower *Phlox drummondii*. *Nature* 469: 411–414.
- Hsu, H.-C., C.-N. Wang, C.-H. Liang, C.-C. Wang, and Y.-F. Kuo. 2017. Association between Petal Form Variation and CYC2-like Genotype in a Hybrid Line of *Sinningia speciosa*. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Huang, T., and V. F. Irish. 2016. Gene networks controlling petal organogenesis. *Journal of Experimental Botany* 67: 61–68.
- Irish, V. F. 2010. The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal* 61: 1014–1028.
- Jackson, M. D. B., S. Duran-Nebreda, D. Kierzkowski, S. Strauss, H. Xu, B. Landrein, O. Hamant, et al. 2019. Global Topological Order Emerges through Local Mechanical Control of Cell Divisions in the Arabidopsis Shoot Apical Meristem. *Cell Systems* 8: 53-65.e3.
- Jaffé, F. W., A. Tattersall, and B. J. Glover. 2007. A truncated MYB transcription factor from *Antirrhinum majus* regulates epidermal cell outgrowth. *Journal of Experimental Botany* 58: 1515–1524.
- Johnson, S. D. 2006. Pollinator-driven speciation in plants. Ecology and evolution of flowers., 295–310. Oxford University Press, Oxford.
- Joly, S., E. Gonzalez, D. Amefese, and H. Alexandre. Comparative transcriptomics of floral transcriptome of three species of Rhytidophyllum (Gesneriaceae) with different pollination syndromes. *in preparation*.
- Joly, S., F. Lambert, H. Alexandre, J. Clavel, É. Léveillé-Bourret, and J. L. Clark. 2018. Greater pollination generalization is not associated with reduced constraints on corolla shape in Antillean plants. *Evolution* 72: 244–260.
- Juenger, T., M. Purugganan, and T. F. C. Mackay. 2000. Quantitative Trait Loci for Floral Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 156: 1379–1392.
- Katoh, K., and D. M. Standley. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kende, H., and J. Zeevaart. 1997. The Five ‘Classical’ Plant Hormones. *The Plant Cell* 9: 1197–1210.
- Kierzkowski, D., and A.-L. Routier-Kierzkowska. 2019. Cellular basis of growth in plants: geometry matters. *Current Opinion in Plant Biology* 47: 56–63.

- Kim, S., J. Koh, M.-J. Yoo, H. Kong, Y. Hu, H. Ma, P. S. Soltis, and D. E. Soltis. 2005. Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *The Plant Journal* 43: 724–744.
- Klahre, U., A. Gurba, K. Hermann, M. Saxenhofer, E. Bossolini, P. M. Guerin, and C. Kuhlemeier. 2011. Pollinator Choice in *Petunia* Depends on Two Major Genetic Loci for Floral Scent Production. *Current Biology* 21: 730–739.
- Kramer, E. M., V. S. Di Stilio, and P. M. Schlüter. 2003. Complex Patterns of Gene Duplication in the APETALA3 and PISTILLATA Lineages of the Ranunculaceae. *International Journal of Plant Sciences* 164: 1–11.
- Krizek, B. A., and J. C. Fletcher. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6: 688–698.
- Kunieda, T., N. Mitsuda, M. Ohme-Takagi, S. Takeda, M. Aida, M. Tasaka, M. Kondo, et al. 2008. NAC Family Proteins NARS1/NAC2 and NARS2/NAM in the Outer Integument Regulate Embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2631–2642.
- Kuo, W.-H., Y.-L. Hung, H.-W. Wu, Z.-J. Pan, C.-Y. Hong, and C.-N. Wang. 2018. Shoot regeneration process and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Sinningia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 134: 301–316.
- Lei, L., S. Li, L. Bashline, and Y. Gu. 2014. Dissecting the molecular mechanism underlying the intimate relationship between cellulose microfibrils and cortical microtubules. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Lenhard, M., A. Bohnert, G. Jürgens, and T. Laux. 2001. Termination of Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Floral Meristems by Interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* 105: 805–814.
- Levin, D. A. 2019. Plant Speciation in the Age of Climate Change. *Annals of Botany*.
- Li, C., and S. Lu. 2014. Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Genomics* 15: 277.
- Li, J., D. Jia, and X. Chen. 2001. HUA1, a Regulator of Stamen and Carpel Identities in *Arabidopsis*, Codes for a Nuclear RNA Binding Protein. *The Plant Cell* 13: 2269–2281.
- Li-Marchetti, C., C. Le Bras, A. Chastellier, D. Relion, P. Morel, S. Sakr, L. H.-S. Oyant, and L. Crespel. 2017. 3D phenotyping and QTL analysis of a complex character: rose bush architecture. *Tree Genetics & Genomes* 13: 112.
- Lin, J.-Z., and K. Ritland. 1997. Quantitative Trait Loci Differentiating the Outbreeding *Mimulus guttatus* From the Inbreeding *M. platycalyx*. *Genetics* 146: 1115–1121.

- Liu, B.-L., X. Yang, J. Liu, Y. Dong, and Y.-Z. Wang. 2014. Characterization, efficient transformation and regeneration of *Chirita pumila* (Gesneriaceae), a potential evo-devo model plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 118: 357–371.
- Losos, J. B. 2010. Adaptive Radiation, Ecological Opportunity, and Evolutionary Determinism. *The American Naturalist* 175: 623–639.
- Lowry, D. B., C. C. Sheng, J. R. Lasky, and J. H. Willis. 2012. Five anthocyanin polymorphisms are associated with an R2R3-MYB cluster in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). *American Journal of Botany* 99: 82–91.
- Luo, D., R. Carpenter, L. Copsey, C. Vincent, J. Clark, and E. Coen. 1999. Control of Organ Asymmetry in Flowers of *Antirrhinum*. *Cell* 99: 367–376.
- Luo, D., R. Carpenter, C. Vincent, L. Copsey, and E. Coen. 1996. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* 383: 794–799.
- Mackay, T. F. C., E. A. Stone, and J. F. Ayroles. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics* 10: 565–577.
- Manchado-Rojo, M., L. Delgado-Benarroch, M. J. Roca, J. Weiss, and M. Egea-Cortines. 2012. Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant Journal* 72: 294–307.
- Marchler-Bauer, A., Y. Bo, L. Han, J. He, C. J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, et al. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* 45: D200–D203.
- Martén-Rodríguez, S., A. Almarales-Castro, and C. B. Fenster. 2009. Evaluation of pollination syndromes in Antillean Gesneriaceae: evidence for bat, hummingbird and generalized flowers. *Journal of Ecology* 97: 348–359.
- Martén-Rodríguez, S., and C. B. Fenster. 2010. Pollen limitation and reproductive assurance in Antillean Gesneriaceae: a specialists vs. generalist comparison. *Ecology* 91: 155–165.
- Martén-Rodríguez, S., and C. B. Fenster. 2008. Pollination Ecology and Breeding Systems of Five *Gesneria* Species from Puerto Rico. *Annals of Botany* 102: 23–30.
- Martén-Rodríguez, S., C. B. Fenster, I. Agnarsson, L. E. Skog, and E. A. Zimmer. 2010. Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. *New Phytologist* 188: 403–417.
- Martén-Rodríguez, S., M. Quesada, A.-A. Castro, M. Lopezaraiza-Mikel, and C. B. Fenster. 2015. A comparison of reproductive strategies between island and mainland Caribbean Gesneriaceae. *Journal of Ecology* 103: 1190–1204.
- Martín-Trillo, M., and P. Cubas. 2010. TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* 15: 31–39.

- Mercuri, A., L. De Benedetti, G. Burchi, and T. Schiva. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of African violet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 39–46.
- Nakazato, T., L. H. Rieseberg, and T. E. Wood. 2013. The genetic basis of speciation in the *Giliopsis* lineage of *Ipomopsis* (Polemoniaceae). *Heredity* 111: 227–237.
- van der Niet, T., and S. D. Johnson. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 353–361.
- Nordborg, M., and D. Weigel. 2008. Next-generation genetics in plants. *Nature* 456: 720–723.
- Ohno, C. K., G. V. Reddy, M. G. B. Heisler, and E. M. Meyerowitz. 2004. The *Arabidopsis* JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* 131: 1111–1122.
- Olsen, A. N., H. A. Ernst, L. L. Leggio, and K. Skriver. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10: 79–87.
- O'Maoileidigh, D. S., E. Graciet, and F. Wellmer. 2014. Chapter Six - Genetic Control of *Arabidopsis* Flower Development. In F. Fornara [ed.], *Advances in Botanical Research, The Molecular Genetics of Floral Transition and Flower Development*, 159–190. Academic Press.
- Orr, H. A. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics* 6: 119.
- Pardo-Diaz, C., C. Salazar, and C. D. Jiggins. 2015. Towards the identification of the loci of adaptive evolution. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 445–464.
- Pelaz, S., G. S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman, and M. F. Yanofsky. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200–203.
- Perez-Rodriguez, M., F. W. Jaffe, E. Butelli, B. J. Glover, and C. Martin. 2005. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers. *Development* 132: 359–370.
- Perret, M., A. Chautems, R. Spichiger, T. G. Barraclough, and V. Savolainen. 2007. The Geographical Pattern of Speciation and Floral Diversification in the Neotropics: The Tribe Sinningieae (gesneriaceae) as a Case Study. *Evolution* 61: 1641–1660.
- Pflieger, S., V. Lefebvre, and M. Causse. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7: 275–291.
- Powell, A. E., and M. Lenhard. 2012. Control of Organ Size in Plants. *Current Biology* 22: R360–R367.
- Preston, J. C., and L. C. Hileman. 2009. Developmental genetics of floral symmetry evolution. *Trends in Plant Science* 14: 147–154.

- Raimundo, J., R. Sobral, P. Bailey, H. Azevedo, L. Galego, J. Almeida, E. Coen, and M. M. R. Costa. 2013. A subcellular tug of war involving three MYB-like proteins underlies a molecular antagonism in *Antirrhinum* flower asymmetry. *The Plant Journal* 75: 527–538.
- Rebocho, A. B., P. Southam, J. R. Kennaway, J. A. Bangham, and E. Coen. 2017. Generation of shape complexity through tissue conflict resolution. *eLife* 6.
- Rieseberg, L. H., and B. K. Blackman. 2010. Speciation genes in plants. *Annals of Botany* 106: 439–455.
- Roalson, E. H., and W. R. Roberts. 2016. Distinct Processes Drive Diversification in Different Clades of Gesneriaceae. *Systematic Biology* 65: 662–684.
- Roalson, E. H., L. E. Skog, and E. A. Zimmer. 2008. Untangling Gloxinieae (Gesneriaceae). II. Reconstructing Biogeographic Patterns and Estimating Divergence Times Among New World Continental and Island Lineages. *Systematic Botany* 33: 159–175.
- Roberts, W. R., and E. H. Roalson. 2017. Comparative transcriptome analyses of flower development in four species of *Achimenes* (Gesneriaceae). *BMC Genomics* 18: 240.
- Sablowski, R. W. M., and E. M. Meyerowitz. 1998. A Homolog of NO APICAL MERISTEM Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92: 93–103.
- Salvi, S., and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science* 10: 297–304.
- Sapir, Y. 2009a. Effects of floral traits and plant genetic composition on pollinator behavior. *Arthropod-Plant Interactions* 3: 115–129.
- Sapir, Y. 2009b. Pollination genetics: Using molecular genetic underlying floral traits to study pollination ecology in an evolutionary context. *Israel Journal of Plant Sciences* 57: 141–149.
- Sargent, R. D. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: 603–608.
- Sauret-Güeto, S., K. Schiessl, A. Bangham, R. Sablowski, and E. Coen. 2013. JAGGED Controls Arabidopsis Petal Growth and Shape by Interacting with a Divergent Polarity Field. *PLOS Biology* 11: e1001550.
- Schiessl, K., S. Kausika, P. Southam, M. Bush, and R. Sablowski. 2012. JAGGED Controls Growth Anisotropy and Coordination between Cell Size and Cell Cycle during Plant Organogenesis. *Current Biology* 22: 1739–1746.
- Schiessl, K., J. M. Muiño, and R. Sablowski. 2014. Arabidopsis JAGGED links floral organ patterning to tissue growth by repressing Kip-related cell cycle inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 2830–2835.

- Schiestl, F. P., and S. D. Johnson. 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution* 28: 307–315.
- Schluter, D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiation*. OUP Oxford.
- Smaczniak, C., R. G. H. Immink, J. M. Muiño, R. Blanvillain, M. Busscher, J. Busscher-Lange, Q. D. (Peter) Dinh, et al. 2012. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1560–1565.
- Smith, J. F., L. C. Hileman, M. P. Powell, and D. A. Baum. 2004. Evolution of GCYC, a Gesneriaceae homolog of CYCLOIDEA, within Gesnerioideae (Gesneriaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 765–779.
- Smith, S. D. 2016. Pleiotropy and the evolution of floral integration. *New Phytologist* 209: 80–85.
- Soltis, P. S., D. E. Soltis, S. Kim, A. Chanderbali, and M. Buzgo. 2006. Expression of Floral Regulators in Basal Angiosperms and the Origin and Evolution of ABC-Function. *Advances in Botanical Research, Developmental Genetics of the Flower*, 483–506. Academic Press.
- Sommer, H., J. P. Beltrán, P. Huijser, H. Pape, W. E. Lönnig, H. Saedler, and Z. Schwarz-Sommer. 1990. Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *The EMBO Journal* 9: 605–613.
- Song, C.-F., Q.-B. Lin, R.-H. Liang, and Y.-Z. Wang. 2009. Expressions of ECE-CYC2 clade genes relating to abortion of both dorsal and ventral stamens in *Opithandra*(Gesneriaceae). *BMC Evolutionary Biology* 9: 244.
- Stapley, J., J. Reger, P. G. D. Feulner, C. Smadja, J. Galindo, R. Ekblom, C. Bennison, et al. 2010. Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 705–712.
- Sun, B., Y. Xu, K.-H. Ng, and T. Ito. 2009. A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes & Development* 23: 1791–1804.
- Szécsi, J., C. Joly, K. Bordji, E. Varaud, J. M. Cock, C. Dumas, and M. Bendahmane. 2006. BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *The EMBO Journal* 25: 3912–3920.
- Theißen, G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 75–85.
- Theißen, G., J. T. Kim, and H. Saedler. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 43: 484–516.

- Theissen, G., and R. Melzer. 2007. Molecular Mechanisms Underlying Origin and Diversification of the Angiosperm Flower. *Annals of Botany* 100: 603–619.
- Tóth, S., C. Kiss, P. Scott, G. Kovács, S. Sorvari, and O. Toldi. 2005. Agrobacterium-mediated genetic transformation of the desiccation tolerant resurrection plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Cell Reports* 25: 442.
- Tóth, S., P. Scott, S. Sorvari, and O. Toldi. 2004. Effective and reproducible protocols for in vitro culturing and plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Science* 166: 1027–1034.
- Trobner, W., L. Ramirez, P. Motte, I. Hue, P. Huijser, W. E. Lonig, H. Saedler, et al. 1992. GLOBOSA: a homeotic gene which interacts with DEFICIENS in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO Journal* 11.
- UniProt Consortium, T. 2018. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 46: 2699–2699.
- Vandenbussche, M., A. Horstman, J. Zethof, R. Koes, A. S. Rijpkema, and T. Gerats. 2009. Differential Recruitment of WOX Transcription Factors for Lateral Development and Organ Fusion in *Petunia* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 2269–2283.
- Venail, J., A. Dell’Olivo, and C. Kuhlemeier. 2010. Speciation genes in the genus *Petunia*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 461–468.
- Via, S., and D. J. Hawthorne. 2005. Back to the future: genetic correlations, adaptation and speciation. *Genetica* 123: 147–156.
- Voorrips, R. E. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93: 77–78.
- Wang, C.-N., H.-C. Hsu, C.-C. Wang, T.-K. Lee, and Y.-F. Kuo. 2015. Quantifying floral shape variation in 3D using microcomputed tomography: a case study of a hybrid line between actinomorphic and zygomorphic flowers. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Weiss, J., L. Delgado-Benarroch, and M. Egea-Cortines. 2004. Genetic control of floral size and proportions. *International Journal of Developmental Biology* 49: 513–525.
- Wellmer, F., E. Graciet, and J. L. Riechmann. 2014. Specification of floral organs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 65: 1–9.
- Wessinger, C. A., L. C. Hileman, and M. D. Rausher. 2014. Identification of major quantitative trait loci underlying floral pollination syndrome divergence in *Penstemon*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369: 20130349–20130349.
- Whittall, J. B., and S. A. Hodges. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447: 706–709.

- Widmer, A., C. Lexer, and S. Cozzolino. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31–38.
- William, D. A., Y. Su, M. R. Smith, M. Lu, D. A. Baldwin, and D. Wagner. 2004. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1775–1780.
- Wuest, S. E., D. S. O'Maileidigh, L. Rae, K. Kwasniewska, A. Raganelli, K. Hanczaryk, A. J. Lohan, et al. 2012. Molecular basis for the specification of floral organs by APETALA3 and PISTILLATA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 13452–13457.
- Xing, Y., Y. Tan, J. Hua, X. Sun, C. Xu, and Q. Zhang. 2002. Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 248–257.
- Xu, B., Z. Li, Y. Zhu, H. Wang, H. Ma, A. Dong, and H. Huang. 2008. Arabidopsis Genes AS1, AS2, and JAG Negatively Regulate Boundary-Specifying Genes to Promote Sepal and Petal Development. *Plant Physiology* 146: 566–575.
- Yamaguchi, N., M.-F. Wu, C. M. Winter, M. C. Berns, S. Nole-Wilson, A. Yamaguchi, G. Coupland, et al. 2013. A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia. *Developmental Cell* 24: 271–282.
- Yang, J., E. Worley, and M. Udvardi. 2014. A NAP-AAO3 Regulatory Module Promotes Chlorophyll Degradation via ABA Biosynthesis in Arabidopsis Leaves. *The Plant Cell* 26: 4862–4874.
- Yang, X., H.-B. Pang, B.-L. Liu, Z.-J. Qiu, Q. Gao, L. Wei, Y. Dong, and Y.-Z. Wang. 2012. Evolution of Double Positive Autoregulatory Feedback Loops in CYCLOIDEA2 Clade Genes Is Associated with the Origin of Floral Zygomorphy[W]. *The Plant Cell* 24: 1834–1847.
- Yang, X., X.-G. Zhao, C.-Q. Li, J. Liu, Z.-J. Qiu, Y. Dong, and Y.-Z. Wang. 2015. Distinct Regulatory Changes Underlying Differential Expression of TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEA-PROLIFERATING CELL FACTOR Genes Associated with Petal Variations in Zygomorphic Flowers of *Petrocosmea* spp. of the Family Gesneriaceae. *Plant Physiology* 169: 2138–2151.
- Yang, Y., B. Chen, X. Dang, L. Zhu, J. Rao, H. Ren, C. Lin, et al. 2019. Arabidopsis IPGA1 is a microtubule-associated protein essential for cell expansion during petal morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*.
- Yang, Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591.
- Yang, Z., and R. Nielsen. 2000. Estimating Synonymous and Nonsynonymous Substitution Rates Under Realistic Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution* 17: 32–43.



- Yuan, Y.-W., J. M. Sagawa, R. C. Young, B. J. Christensen, and H. D. Bradshaw. 2013. Genetic Dissection of a Major Anthocyanin QTL Contributing to Pollinator-Mediated Reproductive Isolation Between Sister Species of *Mimulus*. *Genetics* 194: 255–263.
- Zahn, L. M., J. Leebens-Mack, C. W. dePamphilis, H. Ma, and G. Theissen. 2005. To B or Not to B a Flower: The Role of DEFICIENS and GLOBOSA Orthologs in the Evolution of the Angiosperms. *Journal of Heredity* 96: 225–240.
- Zenoni, S., L. Reale, G. B. Tornielli, L. Lanfaloni, A. Porceddu, A. Ferrarini, C. Moretti, et al. 2004. Downregulation of the *Petunia hybrida*  $\alpha$ -Expansin Gene PhEXP1 Reduces the Amount of Crystalline Cellulose in Cell Walls and Leads to Phenotypic Changes in Petal Limbs. *The Plant Cell* 16: 295–308.
- Zhang, J., Y. Tian, L. Wang, and C. He. 2010. Functional evolutionary developmental biology (evo-devo) of morphological novelties in plants. *Journal of Systematics and Evolution* 48: 94–101.
- Zhang, K., and S.-S. Gan. 2012. An Abscisic Acid-AtNAP Transcription Factor-SAG113 Protein Phosphatase 2C Regulatory Chain for Controlling Dehydration in Senescing Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology* 158: 961–969.
- Zhang, M.-Z., D. Ye, L.-L. Wang, J.-L. Pang, Y.-H. Zhang, K. Zheng, H.-W. Bian, et al. 2008. Overexpression of the cucumber LEAFY homolog CFL and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Plant Molecular Biology* 67: 419–427.
- Zhong, J., and E. A. Kellogg. 2015. Stepwise evolution of corolla symmetry in CYCLOIDEA2-like and RADIALIS-like gene expression patterns in Lamiales. *American Journal of Botany* 102: 1260–1267.
- Zhong, J., and J. C. Preston. 2015. Bridging the gaps: evolution and development of perianth fusion. *New Phytologist* 208: 330–335.
- Zhou, X.-R., Y.-Z. Wang, J. F. Smith, and R. Chen. 2008. Altered expression patterns of TCP and MYB genes relating to the floral developmental transition from initial zygomorphy to actinomorphy in *Bournea* (Gesneriaceae). *New Phytologist* 178: 532–543.
- Zimmer, E. A., E. H. Roalson, L. E. Skog, J. K. Boggan, and A. Idnurm. 2002. Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA trnL-F and trnE-T spacer region sequences. *American journal of botany* 89: 296–311.