

任恒祎,李雅慧,朱秀秀,等. 甜樱桃 RALF 多肽家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报,2024,40(9):1739-1748.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.018

甜樱桃 RALF 多肽家族的全基因组鉴定及表达分析

任恒祎, 李雅慧, 朱秀秀, 许润哲, 张慧君, 李 虎, 刘 春, 范玉朋, 刘 杰,
王继源

(淮北师范大学/安徽省西瓜甜瓜生物育种工程研究中心,安徽 淮北 235000)

摘要: 本研究以甜樱桃(*Prunus avium* L.)为试验材料,采用生物信息学分析的方法探究信号多肽快速碱化因子(RALF)家族,从甜樱桃全基因组数据库中鉴定到 14 个 RALF 相关基因,系统命名为 *PavRALF1~PavRALF14*,从基因家族鉴定、结构分析、进化关系、保守基序和顺式作用元件等方面,对甜樱桃 RALF 基因进行系统鉴定分析,并分析基因在不同组织中的相对表达量。结果表明,甜樱桃 RALF 家族均属于疏水蛋白质,与桃(*Prunus persica*) RALF 基因共线性关系较多,亲缘性较近,在启动子区域存在多种与植物激素和应激相关的顺式作用元件。系统进化树将 RALF 基因分为 5 个亚家族。表达特性分析结果显示,各基因成员在花、茎、叶和果实中均存在不同程度的表达。本研究结果有助于深入研究甜樱桃 RALF 基因家族的生物学功能以及 RALF 基因在甜樱桃生长发育过程中可能发挥的作用。

关键词: 甜樱桃;快速碱化因子(RALF);基因家族鉴定;生物信息学;表达模式分析

中图分类号: S662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)09-1739-10

Genome-wide identification and expression analysis of the RALF polypeptide family in *Prunus avium* L.

REN Hengyi, LI Yahui, ZHU Xiuxiu, XU Runzhe, ZHANG Huijun, LI Hu, LIU Chun,
FAN Yupeng, LIU Jie, WANG Jiyuan

(Huabei Normal University/Anhui Provincial Watermelon and Melon Biological Breeding Engineering Research Center, Huaibei 235000, China)

Abstract: In this study, a bioinformatics analysis was conducted to investigate the rapid alkalization factor (RALF) family in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Fourteen RALF-related genes were identified from the whole genome database of sweet cherry, and were systematically named as *PavRALF1-PavRALF14*. The RALF of sweet cherry was systematically identified and analyzed from various aspects, including gene family identification, structural analysis, evolutionary relationships, conserved motifs, and cis-acting elements. Furthermore, the gene relative expression levels in different tissues were analyzed. The results revealed that the RALF family of sweet cherry belonged to the hydrophobic protein family and exhibited a high degree of colinearity with the RALF of *Prunus persica*, which showed close affinity. Numerous cis-acting elements responsive to hormone and stress response were present in the promoter region of sweet cherry RALF. RALF genes were divided into five subfamilies by phylogenetic tree. The analysis of expression characteristics showed that the gene members were differentially expressed in flowers, stems, leaves, and fruits. The results of this study will be beneficial for further exploring the biological function of the RALF gene family and its potential role in the growth and development of sweet cherry.

收稿日期:2023-12-14

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(2022AH050408)

作者简介:任恒祎(2001-),女,安徽宿州人,硕士研究生,主要从事植物分子育种与分子生物学研究。(E-mail)r15155532860@

163.com

通讯作者:王继源,(E-mail)wangjy@chnu.edu.cn

Key words: sweet cherry; rapid alkalization factor (RALF); identification of gene family; bioinformatics; expression analysis

植物激素的研究近年来受到人们的普遍重视,

所谓植物激素就是指某些微量的可对植物生理过程起调节作用的有机化合物,其在调节植物生长发育过程中发挥着重要作用^[1]。快速碱化因子(RALF)作为多肽类激素广泛分布于植物中,最早是 Pearce 等^[2]在分离纯化烟草蛋白质中的系统素时发现的。随着分子生物学和遗传学的飞速发展,多肽类激素也逐渐走进人们的视野,与传统的植物激素不同,肽类激素是具有激素活性的肽类,成熟的多肽类激素长度较小。

信号多肽 RALF 参与了多种生物学过程,如细胞生长、分化及生成各种代谢产物等^[3-4]。RALF 还可以通过调节 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号转导通路^[5],在细胞增殖、生长、分化、凋亡和代谢等多种生理生化过程中发挥重要作用^[6],同时在植物受到外界逆境胁迫时,作出应答^[7]。RALF 与不同的配体结合,通过不同的靶向机制指导 LRX(富含亮氨酸的重复延伸蛋白)信号蛋白质参与花粉管生长^[8];此外,RALF 家族能够响应植物果实中的脱落酸、生长素、蔗糖、油菜素内酯的信号,从而参与调控果实的脱落和成熟^[9]。

目前 RALF 信号多肽的研究主要集中在拟南芥上^[10-12],研究发现其至少具有 35 个组织特异性表达的 RALF 成员^[13],而在其他作物上的研究相对较少。甜樱桃为蔷薇科落叶乔木,起源于欧洲东南部和亚洲西部,在中国大连、烟台等地被广泛栽培^[14-15]。目前有关甜樱桃 RALF 家族基因功能的研究还比较缺乏。本研究拟运用生物信息学技术对甜樱桃 RALF 基因家族^[16]的成员进行鉴定、表达分析,为深入探究 RALF 基因家族在调控甜樱桃关键农艺性状方面的作用提供有价值的参考。另外,解析多肽激素在甜樱桃果实成熟发育中的作用,对于甜樱桃果实形成、品质提高及绿色防控能够起到重要促进作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为淮北樱桃基地早熟樱桃品种红灯(Hongdeng),株行距为3.0 m×3.0 m,砧木选择吉塞拉砧木,统一栽培管理。于4月4号(幼果期)取花、茎、叶及果实样品,并于4月19日(转色期)、5月2日(全红期)和5月13日(成熟期)继续取果实样品。晚熟品种萨米脱(summit),株行距为3.0 m×3.0 m,砧

木选择吉塞拉砧木,统一栽培管理。于4月4号(幼果期)、4月19日(转色初期)、5月2日(转色中期)和5月13日(全红期)取果实样品。取后立即用液氮速冻,于-80℃冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 甜樱桃全基因组 RALF 基因家族的鉴定 利用 RALF 功能域(PF05498)在隐马尔可夫模型在线工具 HMMER3 中搜索甜樱桃全基因组;为确保结果可靠,在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtRALF 蛋白序列,使用 35 条 AtRALF 蛋白质氨基酸序列在甜樱桃基因组数据库中进行 BLAST,得到候选氨基酸序列,E-value 设置为 1×10^{-5} 。在 Pfam 数据库和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对已获取的 RALF 蛋白进行结构域预测,最终得到含有保守 PavRALF 结构域的基因序列,从而筛选得到甜樱桃(*Prunus avium* L.) RALF 家族成员。

1.2.2 理化性质预测及亚细胞定位、信号肽预测 将鉴定到的氨基酸序列信息提交至在线网站 expasy(<https://web.expasy.org/>)进行相对分子量等理化性质的预测。利用 Wolfpsort(<http://wolfpsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位预测,在网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 上进行信号肽预测。

1.2.3 系统进化分析及基因结构、保守基序与顺式作用元件预测 利用 MEME suit 在线网站(<http://meme-suite.org/index.html>)进行保守基序预测,采用 MEGA 6.0 通过邻接法(Neighbor-joining)构建甜樱桃、桃、拟南芥 RALF 基因家族成员系统进化树,使用 ClustalW 程序进行多序列比对,Bootstrap 运行次数为1 000,其他参数为默认值。将导出的文件利用 Tbttools 进行基因结构、保守序列 motif 的可视化。通过 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 RALF 基因上游 2 000 bp 长度的序列进行转录调控元件分析,并运用 Tbttools 中的 Simple BioSequence Viewer 插件进行可视化分析。

1.2.4 染色体定位分析和共线性分析 将甜樱桃基因组中的基因注释文件导入 Tbttools,利用 Gene Location Visualize from GTF/GFF 插件进行染色体定位分析。分别下载拟南芥和桃全基因组数据及注释 GFF 文件,基于 Tbttools 绘制甜樱桃与拟南芥、桃基因组间的共线性图谱。

1.2.5 基因表达模式分析 为探讨基因在甜樱桃生长发育过程中的作用,对其在甜樱桃的花、茎、叶、果实的相对表达量进行实时荧光定量 PCR 检测及分析。用天根生化科技(北京)有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取甜樱桃各样品总 RNA。以总 RNA 为模板,合成 cDNA。采用荧光定量试剂盒配制 qRT-PCR 体系,以稀释 10 倍的 cDNA 为模板,进行 3 个生物学重复试验,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃 RALF 家族蛋白质理化性质分析

在甜樱桃的基因组中,检测到了 14 个 RALF 蛋白,这些蛋白质被系统命名为 PavRALF1~PavRALF14。通过对甜樱桃 RALF 家族蛋白质理化

性质进行分析,发现这 14 个蛋白质氨基酸数目介于 73~358 aa,预测的相对分子量和等电点分别为 1 996~37 793和4.62~9.67。进一步分析蛋白质的不稳定指数,发现 PavRALF9 蛋白和 PavRALF11 蛋白的不稳定指数在 40.00 以下,属于稳定蛋白质,其他 12 个成员均属于不稳定蛋白质。所有甜樱桃 RALF 家族成员的亲水性平均值均为负数,表明它们均为疏水蛋白质。通过对甜樱桃 RALF 家族进行信号肽预测,发现除了 PavRALF5、PavRALF7、PavRALF10、PavRALF11、PavRALF14 这 5 个家族成员以外,其他家族成员都存在信号肽。此外,通过亚细胞定位预测发现 PavRALF2 和 PavRALF9 只分布在细胞膜上,其他成员在细胞核中均有分布,其中 PavRALF3、PavRALF6、PavRALF10 还分布于细胞膜上,PavRALF4 和 PavRALF8 分布于叶绿体上(表 1)。

表 1 甜樱桃 RALF 基因蛋白质家族信息及理化性质
Table 1 Information of physical and chemical properties of PavRALF gene family

基因编号	蛋白质	氨基酸 序列长度	相对 分子量	等电点	不稳定 指数	脂肪指数	亲水性 总平均值	亚细胞定位	是否存在 信号肽
Pav_sc0000415.1_g250.1.mk	PavRALF1	207	22 632	9.41	58.67	62.67	-0.527	细胞核	是
Pav_sc0000848.1_g840.1.mk	PavRALF2	116	12 906	8.61	52.72	64.05	-0.230	细胞膜	是
Pav_co4087363.1_g010.1.mk	PavRALF3	121	13 119	8.15	54.20	81.57	-0.090	细胞膜、细胞核	是
Pav_sc0001305.1_g760.1.mk	PavRALF4	122	13 788	9.66	55.25	64.02	-0.589	叶绿体、细胞核	是
Pav_sc0000100.1_g380.1.mk	PavRALF5	252	27 879	9.54	51.10	83.17	-0.250	细胞核	否
Pav_sc0003659.1_g060.1.mk	PavRALF6	113	12 136	8.90	54.07	71.68	-0.247	细胞膜、细胞核	是
Pav_sc0001411.1_g040.1.mk	PavRALF7	127	14 195	4.62	63.95	38.43	-1.228	细胞核	否
Pav_sc0000071.1_g530.1.mk	PavRALF8	135	15 438	6.82	59.95	74.52	-0.333	叶绿体、细胞核	是
Pav_sc0000558.1_g330.1.br	PavRALF9	78	8 072	9.01	8.53	72.44	-0.208	细胞膜	是
Pav_sc0000431.1_g200.1.mk	PavRALF10	358	37 793	8.25	46.91	81.48	-0.123	细胞膜、细胞核	否
Pav_sc0004913.1_g140.1.mk	PavRALF11	79	8 988	7.69	33.56	54.18	-0.646	细胞核	否
Pav_sc0001189.1_g210.1.mk	PavRALF12	73	8 073	9.43	45.94	56.16	-0.396	细胞核	是
Pav_sc0001856.1_g050.1.mk	PavRALF13	81	9 076	9.67	54.48	62.59	-0.281	细胞核	是
Pav_sc0000697.1_g250.1.br	PavRALF14	178	1 996	8.52	40.40	52.64	-0.756	细胞核	否

2.2 甜樱桃 RALF 基因结构、保守结构域分析

对甜樱桃 RALF 基因家族进行聚类分析,结果表明,该家族主要分为两大类,PavRALF1、PavRALF6 和 PavRALF10 聚为一类,其他家族成员为一类。通过基因结构分析,发现 PavRALF1、PavRALF5、PavRALF10、PavRALF14 这 4 个基因含有内含子,其余 10 个基因均为单外显子结构。使用在线程序 MEME 分析基序,从

PavRALF 基因中鉴定出 10 个基序(Motif1~Motif10),不同成员间基序分布有一定差异,所有甜樱桃 RALF 含有 1~8 个基序,其中 Motif1 在除 PavRALF10 外的所有成员中均有分布,Motif2 在除 PavRALF9 和 PavRALF10 外的所有成员中均有分布。某些 Motif 为个别成员所特有,如 Motif9 只存在于 PavRALF14 序列中,Motif10 只存在于 PavRALF1 和 PavRALF6 中(图 1)。

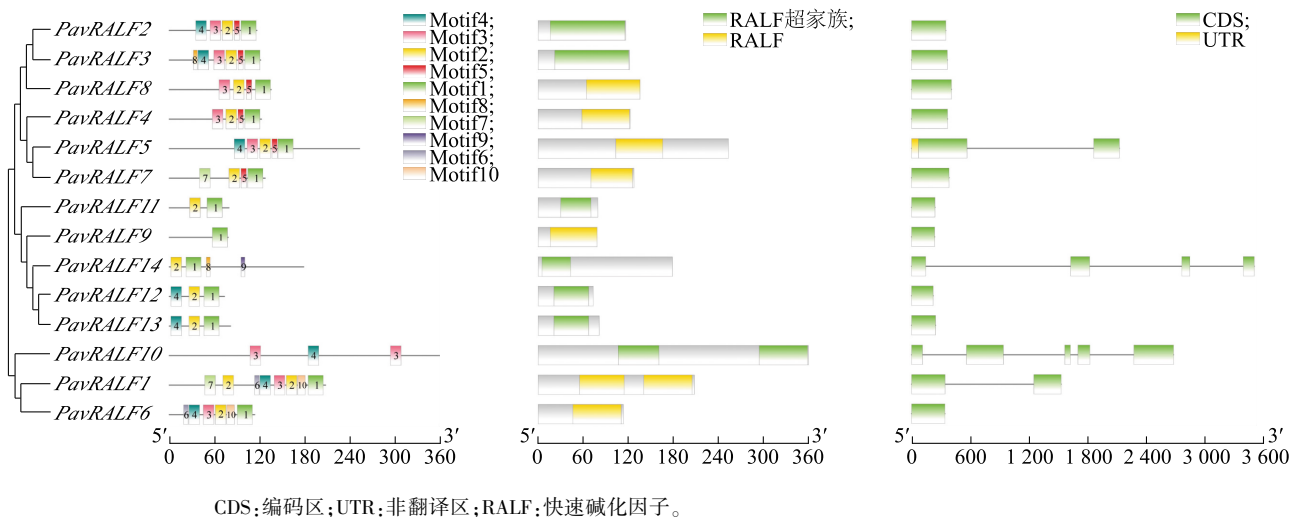


图1 甜樱桃 *RALF* 基因家族结构、保守基序分析
Fig.1 Analysis of gene structure and conserved motif of *RALF* gene family in *Prunus avium* L.

2.3 甜樱桃 *RALF* 基因家族启动子转录调控元件分析

转录调控元件可以通过特定转录因子结合并在下游基因特异性表达过程中发挥调控作用。对转录调控元件的分析结果(图2)表明,*PavRALF* 基因家族的转录调控元件包括光响应元件、激素响应元件、逆境胁迫响应元件、生长素响应元件等。在 14 个基因的启动子区域,光响应元件数量最多。参与光响

应调节的顺式作用元件有 Box 4、GATA-motif、G-box、GT1-motif、TCT-motif 等,激素响应元件包含茉莉酸响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif)、生长素响应元件(TGA-element)、脱落酸响应元件(ABRE)等。非生物应激响应元件包含厌氧诱导响应元件(ARE)、低温响应元件(LTR)等(图3)。因此,可以推测,甜樱桃 *RALF* 可能受到多种环境因素和内源激素的调节,从而对植株的生长和发育产生影响。

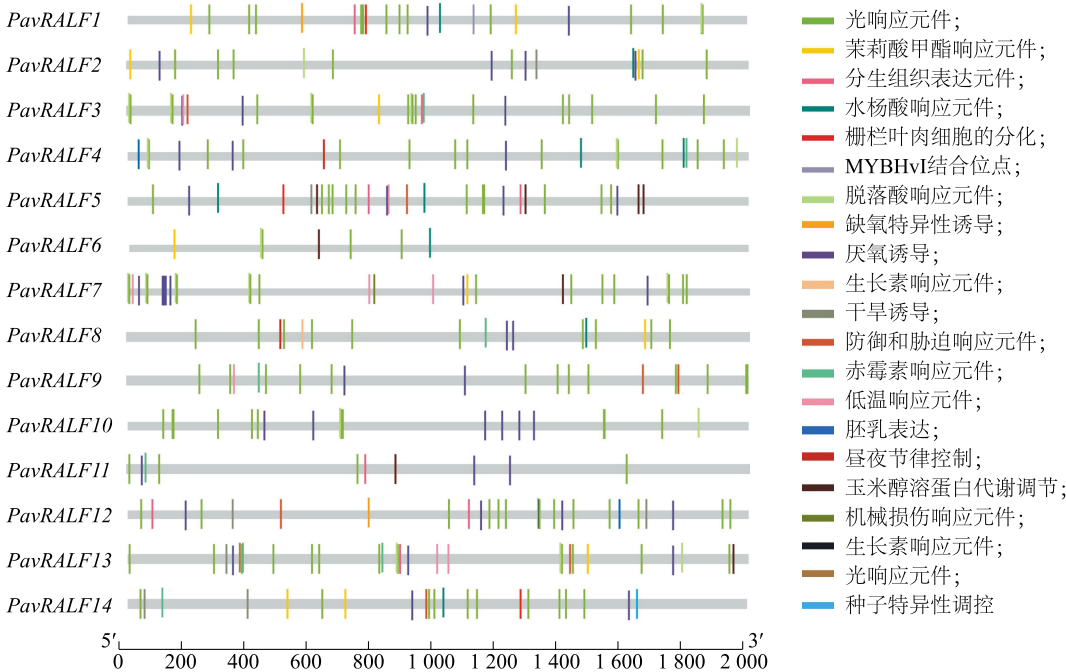
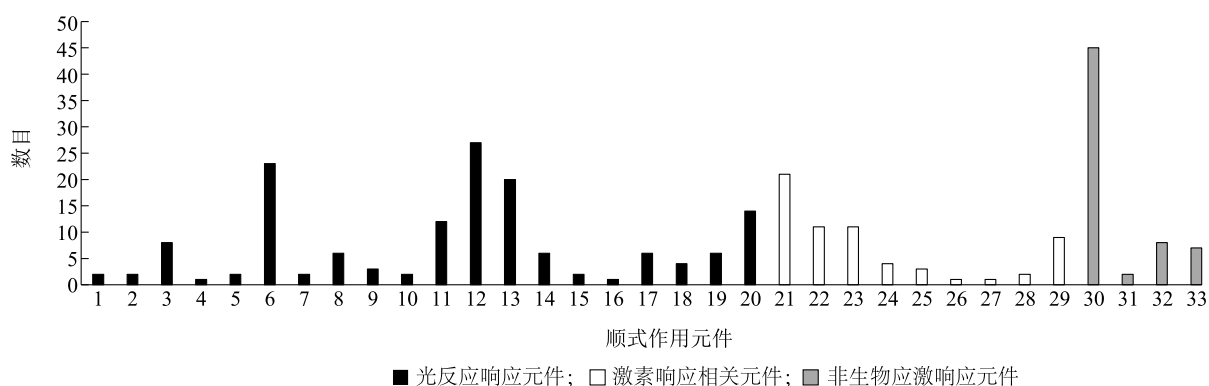


图2 甜樱桃 *RALF* 基因家族转录调控元件分析
Fig.2 Analysis of transcriptional regulatory elements in *RALF* gene family of *Prunus avium* L.



1; 3-AF1 binding site; 2; ACE; 3; AE-box; 4; ATC-motif; 5; ATCT-motif; 6; Box 4; 7; Box II; 8; chs-CMA1a; 9; chs-CMA2a; 10; Gap-box; 11; GATA-motif; 12; G-box; 13; GT1-motif; 14; I-box; 15; LAMP-element; 16; L-box; 17; MRE; 18; Sp1; 19; TCCC-motif; 20; TCT-motif; 21; ABRE; 22; TGACG-motif; 23; CGTCA-motif; 24; TATC-box; 25; P-box; 26; GARE-motif; 27; AuxRR-core; 28; TGA-box; 29; TCA-element; 30; ARE; 31; GC-motif; 32; LTR; 33; MBS。

图3 甜樱桃 *RALF* 基因家族调控元件数量统计

Fig.3 Number of the regulatory elements in *RALF* gene family of *Prunus avium* L.

2.4 甜樱桃 *RALF* 基因家族系统发育树分析

同一进化分支中各成员之间基序分布具有相对一致性。利用拟南芥(35个)、桃(21个)及樱桃(14个) *RALF* 蛋白全长序列构建系统进化树。根据进化关系,这70个 *RALF* 蛋白可分为5个类群,分别是 Group A、Group B、Group C、Group D 和 Group E (图4)。3个物种的 *RALF* 蛋白在 Group A、Group B、Group C 和 Group E 中均有分布,Group B 含有的 *RALF* 蛋白成员数量最多(25个),Group D 最少(1个)。在14个甜樱桃 *RALF* 蛋白中,Group A 有6个 *RALF* 蛋白,Group B 和 Group C 各有3个 *RALF* 蛋白,Group E 有2个 *RALF* 蛋白。

2.5 染色体定位和共线性分析

PavRALF 染色体定位分析结果(图5)显示,在8个染色体上,14个 *PavRALF* 基因的分布呈现出不均匀的趋势。在染色体的分布中,0号和8号染色体的基因数量最多(3条),而4~7号染色体上只有1个基因分布,其余染色体上存在2个基因成员。

为进一步了解甜樱桃 *RALF* 家族基因的进化过程,本研究分析了 *RALFs* 在3个物种(甜樱桃、桃、拟南芥)中的共线性关系(图6),在拟南芥与甜樱桃中发现5对共线性关系,其中2对位于甜樱桃1号染色体上,其余3对分别位于甜樱桃4号、7号、8号染色体上;在桃与甜樱桃中发现11对共线性关系,其中甜樱桃8号染色体上有5对,0号、1号、3号、4号、5号和7号染色体上各分布1对。

由此表明,甜樱桃与桃之间的直系同源基因对多于甜樱桃与拟南芥,甜樱桃与桃的亲缘关系近于拟南芥, *PavRALF* 基因在同科植物之间的保守性更高。

2.6 *PavRALFs* 基因在花、茎、叶组织中的表达模式

如图7所示, *PavRALF* 基因家族在花、茎、叶组织中差异表达,其中 *PavRALF12* 基因在花、茎、叶组织中都大量表达, *PavRALF10* 基因在花和茎中相对表达量较高, *PavRALF4* 基因只在花中相对表达量高,其他家族成员在花、茎、叶组织中微量表达或不表达。由此表明 *PavRALF* 基因在花、茎、叶的生长发育中发挥调控作用。

2.7 甜樱桃 *RALF* 基因在果实中的表达模式分析

对甜樱桃 *RALF* 基因在果实的不同发育时期的相对表达量进行分析,发现 *PavRALF* 基因的相对表达量差异显著。分析结果(图8)表明, *PavRALF10* 在甜樱桃果实的整个发育时期均有较高的相对表达量,其中在果实发育的初期(4月4日~4月19日)相对表达量较高,说明该基因可能是调控甜樱桃果实发育的关键基因,在果实发育初期尤为重要。除 *PavRALF10* 基因以外, *PavRALF8* 和 *PavRALF12* 在甜樱桃果实的转色期(4月19日)具有较高的相对表达量,推测其可能与果实成熟有关。 *PavRALF5* 在甜樱桃果实发育前3个时期表达相对均匀,在成熟期(5月13日)表达较少, *PavRALF5* 可能参与了果实成熟进程。

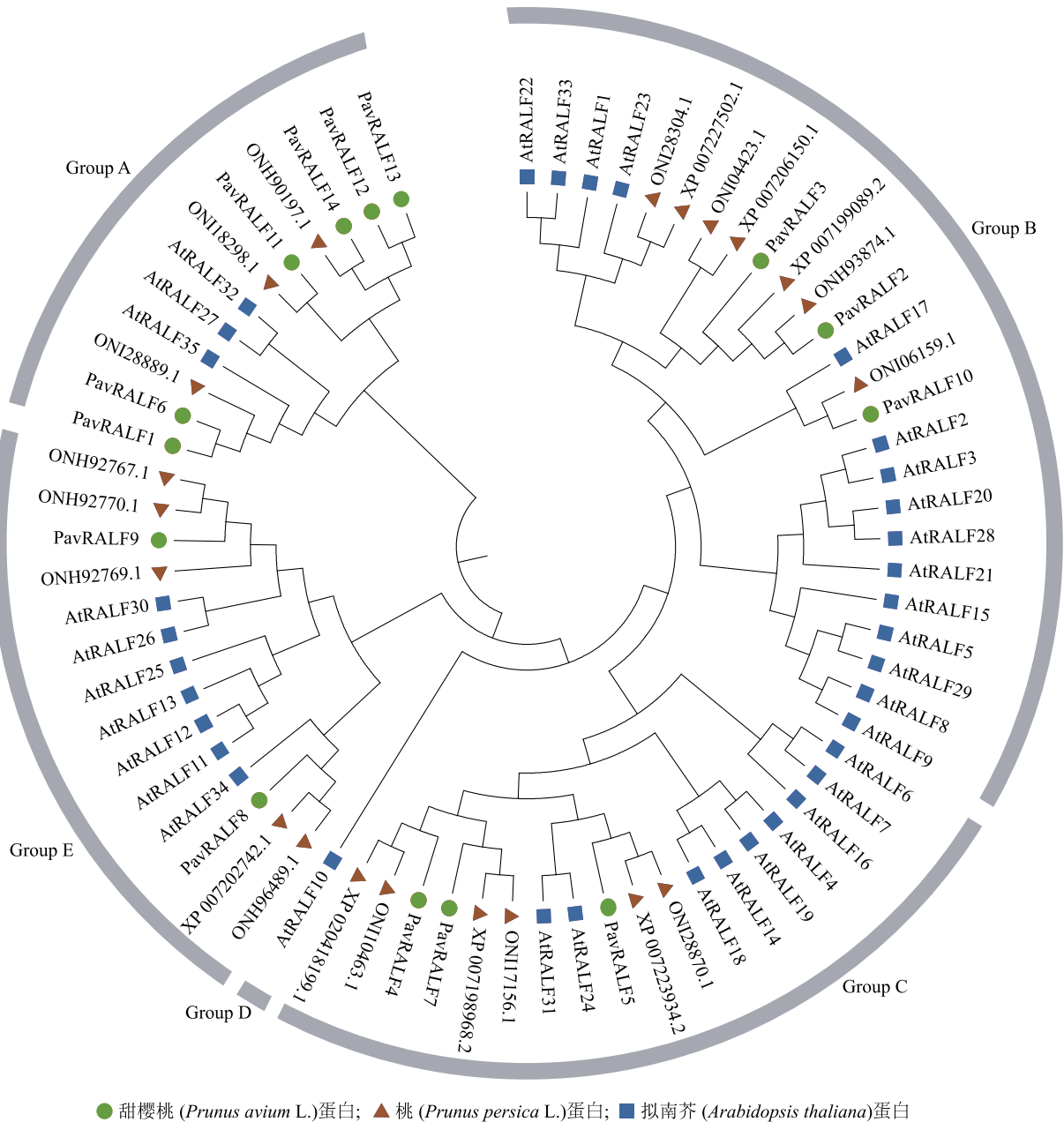


图 4 甜樱桃、拟南芥与桃 RALF 蛋白家族进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of RALF protein family in *Prunus avium* L., *Arabidopsis thaliana*, and *Prunus persica*

2.8 甜樱桃 RALF 基因在早熟和晚熟品种果实中的表达模式分析

为了更加明确 *PavRALF5*、*PavRALF8*、*PavRALF10*、*PavRALF12* 在甜樱桃果实发育中的作用,将上述 4 个基因在早熟和晚熟品种中的相对表达量进行比较。结果(图 9)表明,在早熟品种红灯果实中,*PavRALF5* 转色期(4 月 19 日)相对表达量高于萨米脱;在早熟品种红灯果实中,*PavRALF8* 在幼果期(4 月 4 日)相对表达量较低,但在转色期(4 月 19 日)相对表达量显著高于萨

米脱;在早熟品种红灯果实中,*PavRALF10* 在转色期(4 月 19 日)和全红期(5 月 2 日)与在萨米脱中的相对表达量相似,在幼果期(4 月 4 日)和成熟期(5 月 13 日)显著高于萨米脱;在早熟品种红灯果实中,*PavRALF12* 相对表达量先升高后降低,在转色期(4 月 19 日)显著高于萨米脱,而在晚熟品种萨米脱果实中,*PavRALF12* 相对表达量在前 3 个时期没有明显变化,全红期急剧降低。由此推测,这些基因可能调控甜樱桃果实成熟期,具有促进果实成熟的作用。

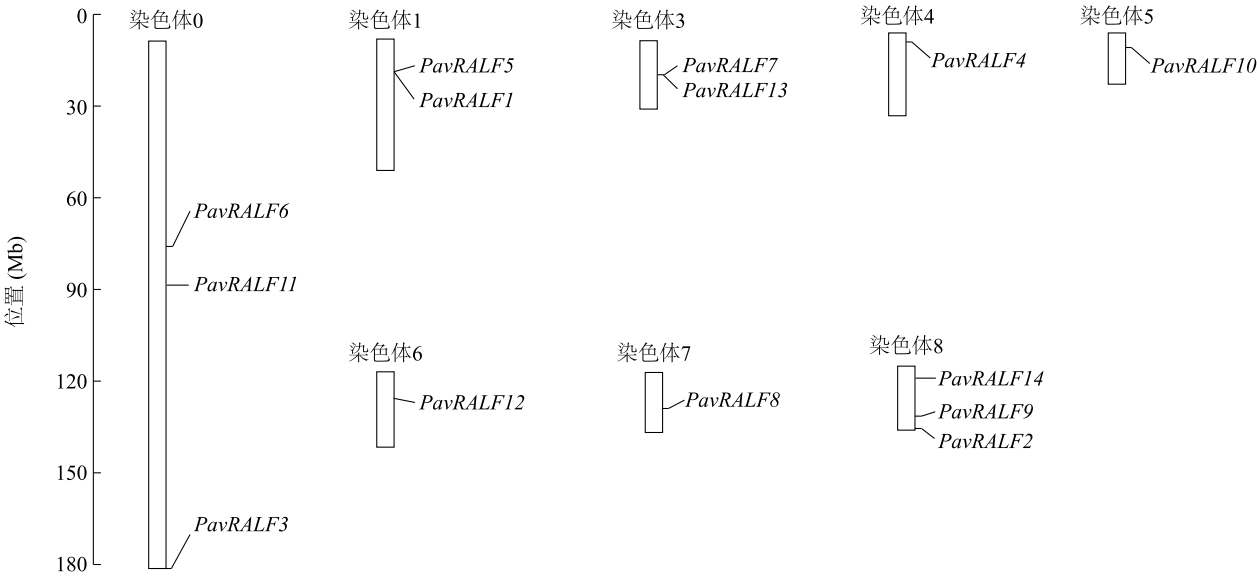
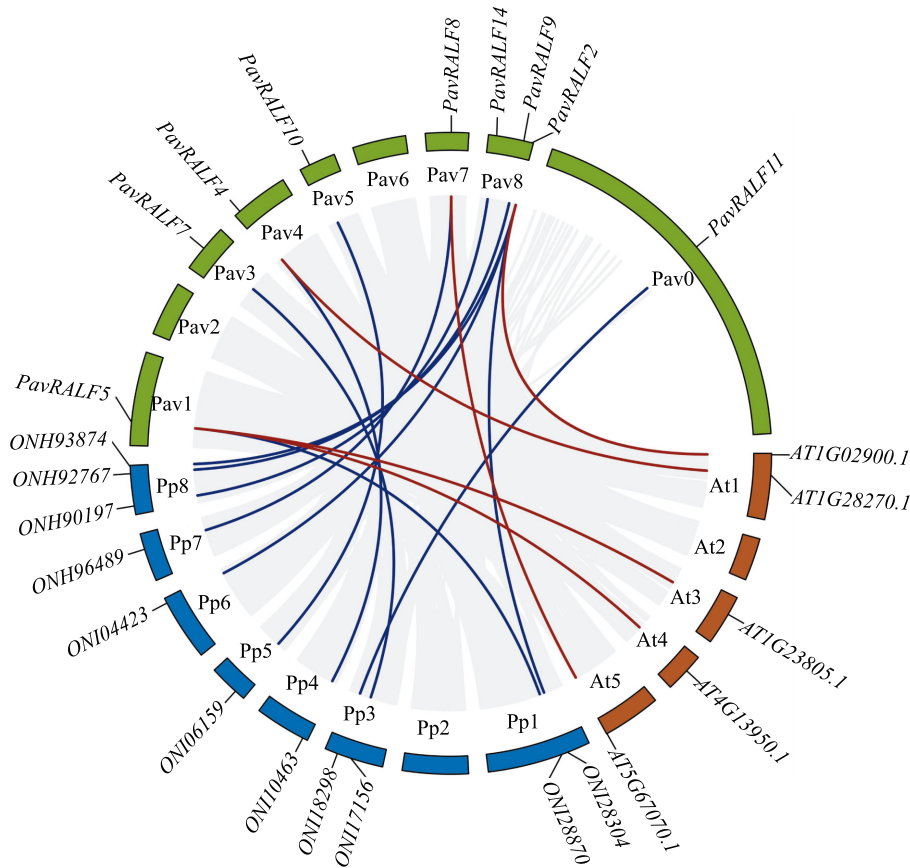
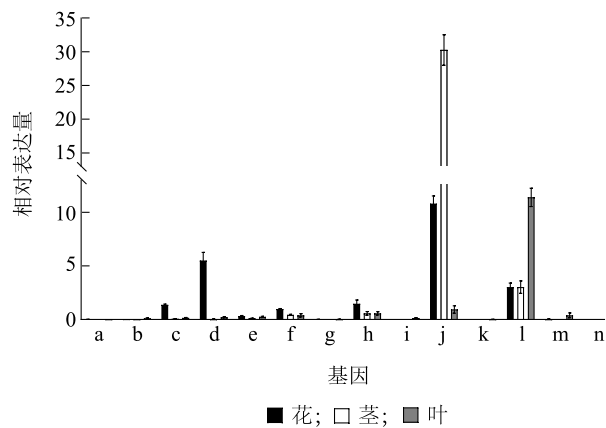


图 5 甜樱桃 *RALF* 基因家族染色体定位
Fig.5 Position of *PavRALF* members on the chromosome



Pav0~Pav8、At1~At5、Pp1~Pp8 分别为甜樱桃、拟南芥和桃的染色体; *PavRALF2*、*PavRALF4*、*PavRALF5*、*PavRALF7*~*PavRALF11*、*PavRALF14* 为甜樱桃基因; *AT1G02900.1*、*AT1G28270.1*、*AT3G23805.1*、*AT4G13950.1* 为拟南芥基因; *ONH93874*、*ONH92767*、*ONH90197*、*ONH96489*、*ONI04423*、*ONI06159*、*ONI10463*、*ONI18298*、*ONI17156* 为桃基因。

图 6 甜樱桃 *RALF* 基因家族共线性分析
Fig.6 Collinearity analysis of the *RALF* gene family in *Prunus avium* L.



a: *PavRALF1*; b: *PavRALF2*; c: *PavRALF3*; d: *PavRALF4*; e: *PavRALF5*; f: *PavRALF6*; g: *PavRALF7*; h: *PavRALF8*; i: *PavRALF9*; j: *PavRALF10*; k: *PavRALF11*; l: *PavRALF12*; m: *PavRALF13*; n: *PavRALF14*。

图7 甜樱桃 *RALF* 基因在花、茎、叶组织中的表达

Fig.7 Expression of *Prunus avium* L. *RALF* genes in flower, stem and leaf tissues

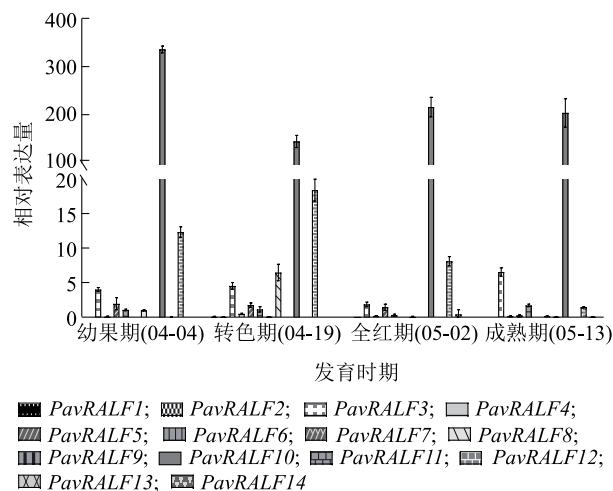


图8 甜樱桃 *RALF* 基因在果实中的表达

Fig.8 Expression of *RALF* genes in *Prunus avium* L. fruit

3 讨论与结论

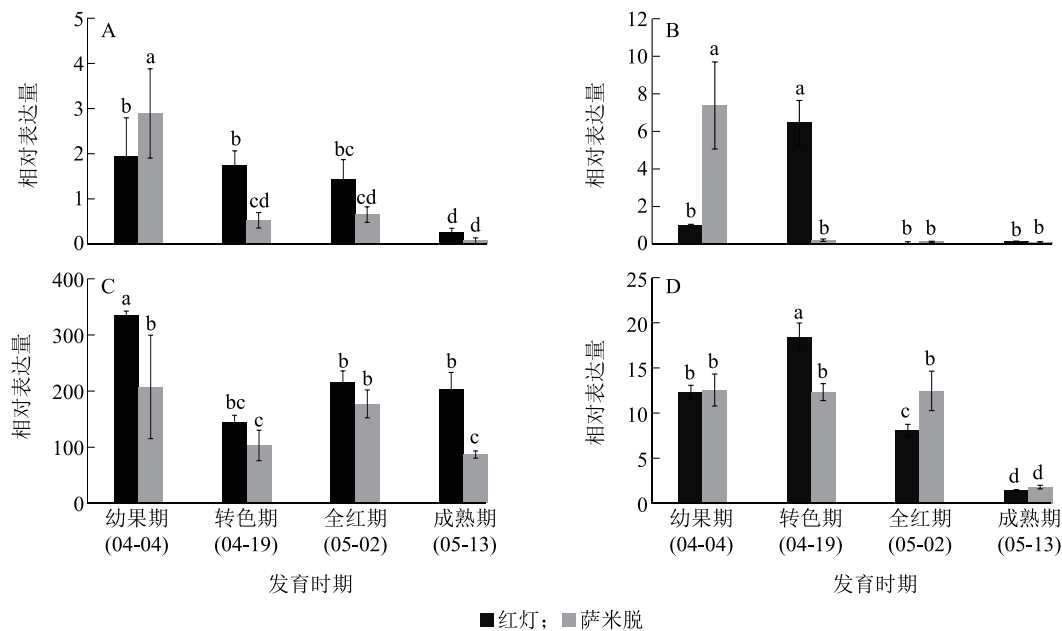
RALF (快速碱化因子) 是一种相对分子量大小约为5 000的富含半胱氨酸的小分子肽,参与调节根生长发育、花粉发育和果实成熟,能够引起胞外 pH 迅速上升,对植物的生长发育具有一定作用^[17-19],参与调控植物生长发育以及应对外界逆境胁迫并作出响应^[20-21]。目前已经在多种植物中发现了 *RALF* 基因家族成员,其中,拟南芥 *RALF* 基因家族的基因

组中包含 39 个成员,此外,水稻、玉米和大豆 *RALF* 基因家族的基因组中的成员数量分别为 43 个、34 个和 34 个^[22]。本研究从甜樱桃基因组中共鉴定了 14 个 *RALF* 家族成员,并进行系统命名。甜樱桃 *RALF* 基因组家族成员数量低于其他物种,可能与不同物种之间基因扩张程度不同有关^[23]。非生物反应是指光、激素、温度等在植物生长发育过程中,通过调控基因启动子上的顺式作用元件参与调控植物体内基因的表达。在桑树和巴西橡胶树的 *RALF* 基因家族启动子序列中也发现与激素和抗逆等相关的响应元件^[24-25]。香蕉的 *MaRALF* 基因家族参与非生物胁迫、响应环境及激素的诱导,如高盐、低温、重金属和激素(赤霉素、脱落酸)等,都可以调控 *RALF* 基因家族的表达^[26]。同样,在甜樱桃 *RALF* 基因家族中也发现了这些响应元件,这为后续研究甜樱桃生长发育和抗逆胁迫的分子机制和基因资源利用提供了基础。

RALF 基因调控植物的根、茎、叶等各个组织的生长。Group B 中拟南芥 *RALF1* 过表达会导致叶片变小、根长变短、植株矮化。同时, *RALF1*-FER/RIPK 信号通路响应 *RALF1* 信号,并抑制主根细胞生长,也在逆境胁迫响应中发挥一定的作用^[27-28]。Group C 类群中 *RALF* 基因主要参与花的发育,在拟南芥中, *RALF4* 和 *RALF19* 在成熟花粉粒和花粉管中表达, *RALF4* 和 *RALF19* 在受体复合物 BUPS1/2-ANX1/2 中的自分泌信号传导能保持花粉管的生长和完整性^[29]。甜樱桃与拟南芥之间存在共线性关系, *RALF* 基因在不同组织中的表达模式具有差异,表明它们在甜樱桃的生长发育过程中也可能起着不同的作用。

RALF 基因调控果实的成熟。王科等^[9]的研究结果表明, *RALF* 基因家族成员在果实成熟的进程中均有表达,同时验证了 *FaRALF1* 正调控草莓果实成熟。在草莓中, *FvRALF5*、*FvRALF10* 和 *FvRALF12* 可能参与调控草莓果实发育^[30]。相较于晚熟甜樱桃品种, *PavRALF5*、*PavRALF8*、*PavRALF10* 和 *PavRALF12* 在早熟品种果实成熟过程中表达差异显著,这些基因可能在调控果实成熟期中起到关键作用。其中有些甜樱桃 *RALF* 家族成员在果实中的表达水平相对较低,推测其可能不参与果实发育。

综上,本研究鉴定出 14 个 *PavRALF* 基因,并对甜樱桃 *PavRALF* 基因家族进行系统鉴定与表达分



A: *PavRALF5*; B: *PavRALF8*; C: *PavRALF10*; D: *PavRALF12*; 不同小写字母表示不同样品之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图9 甜樱桃 RALFs 基因在早熟和晚熟品种果实中的表达

Fig.9 Expression of RALF genes in early and late maturing varieties of *Prunus avium* L. fruits

析。结果表明, *PavRALF* 在甜樱桃的生长发育过程中发挥作用, 并且 *PavRALF5*、*PavRALF8*、*PavRALF10* 和 *PavRALF12* 可能与果实成熟相关, 对指导甜樱桃成熟期调控研究有重要意义。

参考文献:

- [1] 石永春, 王小彦, 刘卫群. 植物肽激素——快速碱化因子研究进展[J]. 河南农业科学, 2008, 37(5): 5-8.
- [2] PEARCE G, MOURA D S, STRATMANN J, et al. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(22): 12843-12847.
- [3] CAO J, SHI F. Evolution of the RALF gene family in plants: gene duplication and selection patterns[J]. Evol Bioinform Online, 2012, 2012(8): 271-292.
- [4] CANTO A M D, CECILIATO P H O, RIBEIRO B, et al. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2014, 75: 45-54.
- [5] HARUTA M, SABAT G, STECKER K, et al. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion[J]. Science, 2014, 343(6169): 408-411.
- [6] ZHANG X, YANG Z, WU D, et al. RALF-FERONIA signaling: linking plant immune response with cell growth[J]. Plant Communications, 2020, 1(4): 13.
- [7] 王彬, 陈敏, 林亮, 等. 植物干旱胁迫的信号通路及相关

转录因子研究进展[J]. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1792-1806.

- [8] MOUSSU S, BROYART C, SANTOS-FERNANDEZ G, et al. Structural basis for recognition of RALF peptides by LRX proteins during pollen tube growth[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(13): 7494-7503.
- [9] 王科, 张卿, 董清华. *FaRALF1* 基因调控‘红颜’草莓果实成熟的功能分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(3): 842-849.
- [10] BERGONCI T, RIBEIRO B, CECILIATO P H, et al. *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation[J]. J Exp Bot, 2014, 65(8): 2219-2230.
- [11] ABARCA A, FRANCK C M, ZIPFEL C. Family-wide evaluation of rapid alkalization factor peptides[J]. Plant Physiol, 2021, 187(2): 996-1010.
- [12] ZHONG S, LI L, WANG Z J, et al. RALF peptide signaling controls the polytubey block in *Arabidopsis*[J]. Science (New York, N.Y.), 2022, 375(6578): 290-296.
- [13] STEGMANN M, MONAGHAN J, SMAKOWSKA-LUZAN E, et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling[J]. Science, 2017, 355(6322): 287-289.
- [14] 阿布来克·尼牙孜, 杜润清, 章世奎, 等. 3个甜樱桃品种在南疆地区的引种表现[J]. 天津农业科学, 2017, 23(2): 95-100.
- [15] 张力思. 甜樱桃的起源、分布及栽培现状[J]. 北方果树, 2000(4): 31.
- [16] KENTA S, KANJI I, MITSUNOBU I, et al. The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted

- breeding[J]. DNA Research, 2017(5):499-508.
- [17] 李焰焰, 曹家树, 黄 鹏. 植物多肽信号分子 RALF 的研究进展[J]. 生物学杂志, 2006, 23(5):1-4.
- [18] HUGO G, ERIC C, SÉBASTIEN C, et al. Characterization of five *RALF*-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants[J]. Planta, 2005, 220(3):447-454.
- [19] BLACKBURN M R, HARUTA M, MOURA D S. Twenty years of progress in physiological and biochemical investigation of RALF peptides[J]. Plant Physiology, 2020, 182(4):1657-1666.
- [20] FRANSSEN H J, BISSELING T. Peptide signaling in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Peptide Signaling in Plants, 2001, 98(23):12855-12856.
- [21] MATSUBAYASHI Y, YANG H, SAKAGAMI Y. Peptide signals and their receptors in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(12):573-577.
- [22] SHARMA A, HUSSAIN A, MUN B, et al. Comprehensive analysis of plant rapid alkalization factor (*RALF*) genes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 106(2016):82-90.
- [23] 王世泽, 李 云, 韩玉翠, 等. 烟草 *TCP* 家族成员鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1):226-238.
- [24] 李文生. 桑树 *RALF* 基因及表达模式分析[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [25] 杨 洪, 王立丰, 代龙军, 等. 巴西橡胶树 *RALF* 基因家族的鉴定及其表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(19):6348-6355.
- [26] 陈 晓. 香蕉 *MaRALF* 基因功能的初步探究[D]. 广州: 广州大学, 2018.
- [27] DU C Q, LI X S, CHEN J, et al. Receptor kinase complex transmits RALF peptide signal to inhibit root growth in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(51):E8326-E8334.
- [28] 强晓楠, 李 鑫, 陈 佳, 等. 拟南芥 RALF 多肽家族的功能多样性初步分析[J]. 生物技术通报, 2019, 35(1):2-10.
- [29] MECCHIA M A, SANTOSFERNANDEZ G, DUSS N N, et al. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*[J]. Science, 2017, 358(6370):1600-1603.
- [30] ZHANG H, JING X, CHEN Y, et al. The genome-wide analysis of *RALF*-Like genes in strawberry (wild and cultivated) and five other plant species (Rosaceae)[J]. Genes, 2020, 11(2):174.

(责任编辑:陈海霞)