

王占军, 李静静, 周子寒, 等. 油桐 *ARF* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(6): 984-992.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.06.004

油桐 *ARF* 基因家族的鉴定及表达分析

王占军^{1,2}, 李静静¹, 周子寒¹, 孙婉¹, 王毅¹, 张颢²

(1. 合肥师范学院生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 湖南省林业科学院省部共建木本油料资源利用国家重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要: 植物生长发育由多种激素共同调控, 其中生长素是重要的调控激素之一。生长素响应因子(Auxin response factor, ARF)是生长素信号传导过程中的关键因子, 它能够特异性地与生长素应答元件结合, 进而影响植物体内生长素响应基因的表达。本研究通过生物信息学方法鉴定到 17 个油桐 *ARF* 基因家族成员, 分布在 9 条染色体上, 并且各基因间无片段重复现象。理化性质分析结果表明, *ARF* 蛋白长度为 587~1 119 aa, 均为酸性蛋白质, 不稳定性系数>40, 为不稳定蛋白质, 亲水性指数<0, 为亲水性蛋白质。根据系统进化分析结果将油桐 *ARF* 蛋白家族分为 4 个亚族, 与拟南芥的亚族划分一致。每个成员都具有典型的 B3 型结构域和 Auxin_resp 中间结构域。分析 *ARF* 基因表达特征发现, *ARF* 基因的表达在油桐不同组织中具有明显的组织特异性。本研究结果为揭示油桐生长发育调控机制提供了理论依据。

关键词: 油桐; *ARF* 基因家族; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S794.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)06-0984-09

Identification and expression analysis of *ARF* gene family in *Vernicia fordii*

WANG Zhanjun^{1,2}, LI Jingjing¹, ZHOU Zihan¹, SUN Wan¹, WANG Yi¹, ZHANG Xie²

(1. School of Biology and Food Engineering, Hefei Normal University, Hefei 230601, China; 2. State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract: Plant growth and development is regulated by many hormones, among which auxin is one of the important regulatory hormones. Auxin response factor (ARF) is a key factor in the process of auxin signal transduction, which can specifically bind to auxin response elements and affect the expression of auxin response genes in plants. In this study, 17 members of *ARF* gene family in *Vernicia fordii* were identified by bioinformatics method, which were distributed on nine chromosomes, and there was no fragment duplication between genes. The results of physical and chemical properties analysis showed that the length of ARF proteins was 587~1 119 aa, all of them were acid proteins. The instability coefficients of ARF proteins were more than 40, and the ARF proteins were unstable proteins. The hydropathicity indexes of ARF proteins were less than 0, and the ARF proteins were hydrophilic proteins. According to the results of phylogenetic analysis, the ARF protein family

of *Vernicia fordii* was divided into four subfamilies, which was consistent with the subfamily division of *Arabidopsis thaliana*. Each member had a typical B3 domain and an auxin_resp intermediate domain. By analyzing the expression characteristics of *ARF* gene, it was found that the expression of *ARF* gene had obvious tissue specificity in different tissues of *Vernicia fordii*. The results of this study provide a theoretical basis for revealing the regulatory mechanism of *Vernicia fordii* growth and development.

Key words: *Vernicia fordii*; *ARF* gene family; bioinformatics analysis; expression analysis

收稿日期: 2024-02-05

基金项目: 省部共建木本油料资源利用国家重点实验室开放课题 (GZKF202103, GZKF202203); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (gxyq2020040); 安徽省级大学生创新创业训练计划项目 (S202414098204, S202414098205); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202414098077); 2022 年度引进高层次人才科研启动基金项目 (2022rcjj12)

作者简介: 王占军 (1984-), 男, 安徽寿县人, 博士研究生, 从事植物细胞分子生物学研究。(E-mail) wangzhanjunhxj@163.com。李静静为共同第一作者。

通讯作者: 张颢, (E-mail) zhangxie3@163.com

油桐 (*Vernicia fordii*) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 油桐属落叶乔木树种,其整株都具有极高的应用价值,根、叶、花、果均可入药^[1];并且油桐既有能源和经济价值,又是重要的用材树种^[2]。

植物生长素响应因子 (Auxin response factor, ARF) 是生长素信号传导过程中的关键因子,其能够特异性地结合生长素应答元件,从而影响植物体内生长素响应基因的表达^[3]。植物生长素调控涉及多个基因家族,机制十分复杂,对生长素响应因子的研究有助于揭示植物生长发育调控机制。ARF 基因在多种植物中的功能已被揭示。例如,在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 研究中发现,AtARF17 促进花药发育和花粉管壁形成^[4],AtARF1 和 AtARF2 参与花器官的发育和凋谢过程^[5],AtARF6 和 AtARF8 促进花器官成熟^[6]。葡萄 (*Vitis vinifera*) 中 VvARF7 基因能响应红蓝光,促进花芽分化^[7]。另外,ARF 基因家族还在植物抗逆境胁迫响应中发挥着重要作用。冷胁迫条件下,香蕉 (*Musa acuminata*) 中 17 条 MaARF 基因被诱导,26 条 MaARF 基因被抑制^[8]。下调 SlARF4 表达,番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的抗盐和抗干旱能力增强^[9]。通过对二穗短柄草 (*Brachypodium distachyo*) 的研究,发现 BdARF4 和 BdARF8 基因均参与了水杨酸信号通路调控,可以缓解重金属胁迫^[10]。

目前,油桐全基因组数据测序已经完成,但对于油桐 ARF 转录因子的相关研究却鲜见报道。因此,本研究利用生物信息学技术,基于油桐全基因组数据鉴定出油桐 ARF 基因家族成员,并对油桐 ARF 基因家族进行系统分析,旨在阐释生长素响应因子 ARF 在油桐生长发育进程中的功能与作用机制。

1 材料与方法

1.1 基因序列来源

油桐全基因组数据^[11]来源于中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室 (<https://bigd.big.ac.cn/gsa/>);在拟南芥数据库网站 TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) 下载拟南芥 ARF 蛋白氨基酸序列;水稻 (*Oryza sativa*) 的 ARF 蛋白氨基酸序列下载自 NCBI 数据库网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);巨桉 (*Eucalyptus grandis*)、麻疯树 (*Jatropha curcas*) 和蓖麻 (*Ricinus communis*) 的 ARF 蛋白氨基酸序列下载自 Plant TFDB 数据库网站 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn>)。

1.2 油桐 ARF 基因家族成员的鉴定及其编码蛋白质理化性质分析

首先,从 Pfam 网站 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 ARF 基因家族的隐马尔科夫模型文件 (PF06507)^[12],再使用 HMMER3.0 软件对油桐 ARF 转录因子家族成员进行搜索,筛选出候选序列^[13]。其次,利用本地 BLASTP 软件比对拟南芥 ARF 基因与油桐基因组序列,选取 E 值 $< 1 \times 10^{-10}$ 的序列。针对两种方法获得的重复氨基酸序列只需保留其一,初步确定油桐的 ARF 基因家族成员。之后借助 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进一步确认 ARF 蛋白保守结构域^[14-15]。最终鉴定得到 ARF 基因家族成员,并根据 BLAST 命名法和系统命名法,对油桐 ARF 基因进行命名。

对油桐 ARF 基因家族成员编码的蛋白质氨基酸序列应用在线软件 ProtParam^[16] (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行预测分析,分析其相对分子量 (Relative molecular weight)、等电点 (Isoelectric point)、不稳定性系数 (Instability index)、亲水性指数 (Hydrophaticity index)、脂溶指数 (Aliphatic index) 等理化性质,油桐 ARF 蛋白的亚细胞定位分析利用 Plant-mPLocserver 在线网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)^[17]。

1.3 ARF 家族的系统发育分析

利用软件 MEGA 11^[18] 对油桐、拟南芥、水稻、巨桉、麻疯树和蓖麻的 ARF 蛋白进行多序列分析比对,比对结果利用邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树,使用泊松校正法计算进化距离,校验参数 (Bootstrap) 为 1 000,其余参数设置为初始的默认值。最后通过 Evolview (<http://www.evolgenius.info/evolview/#/>) 在线美化进化树。

1.4 油桐 ARF 基因家族的基因及其编码蛋白质结构分析

将已鉴定出的油桐 ARF 的 CDS 序列和对应的基因组 DNA 序列上传至基因结构显示网站^[19] (<http://gsds.gao-lab.org/>),在线分析其基因结构特征。

运用 MEME^[20] 在线工具分析该家族的蛋白质基序,最大基序检索数目设置为 10,其他参数均为默认值。随后通过 TBtools^[21] 软件获得可视化呈现。对筛选得到的油桐各 ARF 蛋白的保守结构域采用在线软件 SMART 分析,并利用 TBtools 软件进行作

图。

1.5 油桐 ARF 基因家族成员的染色体定位

借助 TBtools 程序的 GENE 定位功能对油桐中筛选出的 ARF 基因进行染色体定位。

1.6 油桐 ARF 基因家族的基因表达分析

收集油桐不同生长时期、不同组织的转录组数据^[22],包括开花后 10 周的种子(S1)、开花后 15 周的种子(S2)、开花后 20 周的种子(S3)、开花后 25 周的种子(S4)、开花后 30 周的种子(S5);不同发育时期的花蕾:开花前 30 d 的雌蕾(C1)和雄蕾(X1)、开花前 20 d 的雌蕾(C2)和雄蕾(X2)、开花前 10 d 的雌蕾(C3)和雄蕾(X3)、开花前 1 d 的雌蕾(C4)和雄蕾(X4);8 年生油桐的根(root)、茎(stem)、叶(leave)。在转录组数据库中检索 17 个油桐 ARF 基因的表达值(FPKM),并使用 TBtools 软件中的 Heat Map 模块绘制差异表达热图。

2 结果与分析

2.1 油桐 ARF 基因家族成员的鉴定结果及其编码蛋白质理化性质

首先利用隐马尔可夫模型和 BLASTP 算法对油

桐全基因组进行搜索,筛选出油桐的 ARF 基因序列。在此基础上,通过交叉筛选以及保守结构域的筛选(去除不含 Auxin_resp 结构域的蛋白质氨基酸序列),最终共鉴定出 17 个油桐 ARF 基因家族成员。与其他物种 ARF 基因研究结果相比,本研究鉴定出的油桐 ARF 基因家族成员数量比水稻、拟南芥、大豆(*Glycine max*)等物种略少,与巨桉、麻疯树、蓖麻等物种 ARF 基因家族成员数量一致。

油桐 ARF 蛋白基本理化性质如表 1 所示,17 个油桐 ARF 蛋白氨基酸序列长度为 587~1 119 aa,其中 VfARF17 最短,VfARF19A 最长。蛋白质相对分子量为 64 510.90~124 993.45,其中 VfARF17 相对分子量最小,VfARF19A 相对分子量最大。理论等电点为 5.10~6.93,表明 17 个 ARF 蛋白等电点<7,属酸性蛋白质。油桐 ARF 蛋白不稳定系数为 47.86~74.30,不稳定系数>40,均属于易分解的不稳定蛋白质。油桐 ARF 蛋白亲水性指数为-0.684~-0.262,亲水性指数<0;亲水性指数为负值时表示为亲水性,反之,正值时则表示为疏水性,表明油桐 ARF 蛋白都是亲水性蛋白。亚细胞结构定位预测结果显示,油桐 ARF 蛋白均位于细胞核中。

表 1 油桐 ARF 蛋白理化性质

Table 1 Physicochemical properties of ARF proteins in *Vernicia fordii*

蛋白	基因 ID	长度(aa)	相对分子量	等电点	不稳定性系数	脂溶指数	亲水性指数	染色体定位	亚细胞定位
VfARF1	Vf03G0577	626	70 090.58	5.50	57.43	71.71	-0.543	2 号染色体	细胞核
VfARF2A	Vf10G0693	867	97 228.08	6.21	54.93	65.86	-0.663	9 号染色体	细胞核
VfARF2B	Vf07G2632	806	90 870.85	6.22	52.75	75.11	-0.506	6 号染色体	细胞核
VfARF3	Vf07G0929	740	81 583.59	6.44	58.74	66.93	-0.456	6 号染色体	细胞核
VfARF4	Vf02G0319	794	87 946.14	6.75	55.02	71.42	-0.488	1 号染色体	细胞核
VfARF5	Vf09G1936	946	104 148.76	5.10	49.37	74.40	-0.451	8 号染色体	细胞核
VfARF6	Vf07G1244	970	107 935.43	5.99	65.33	74.58	-0.449	6 号染色体	细胞核
VfARF8	Vf05G0846	827	92 567.79	5.96	62.30	71.19	-0.531	4 号染色体	细胞核
VfARF9A	Vf06G2381	700	77 552.16	6.06	54.45	70.59	-0.483	5 号染色体	细胞核
VfARF9B	Vf05G1995	694	77 769.50	6.49	63.12	70.49	-0.584	4 号染色体	细胞核
VfARF10	Vf02G0272	690	75 946.75	6.93	48.93	76.16	-0.344	1 号染色体	细胞核
VfARF16A	Vf03G2326	689	75 897.69	5.86	48.66	73.73	-0.339	2 号染色体	细胞核
VfARF16B	Vf04G0101	691	76 107.08	6.36	51.89	71.26	-0.398	3 号染色体	细胞核
VfARF17	Vf09G1145	587	64 510.90	5.78	52.09	72.57	-0.262	8 号染色体	细胞核
VfARF19A	Vf08G1465	1 119	12 4993.45	6.04	74.30	68.51	-0.684	7 号染色体	细胞核
VfARF19B	Vf09G0184	1 111	12 2558.40	6.17	65.22	73.65	-0.547	8 号染色体	细胞核
VfARF24	Vf06G1974	819	91 662.46	5.57	47.86	76.39	-0.450	5 号染色体	细胞核

2.2 ARF 家族的系统发育树

为揭示 ARF 家族的系统进化关系,选取 6 个物种:拟南芥(23 条 ARF 蛋白)、油桐(17 条 ARF 蛋白)、水稻(25 条 ARF 蛋白)、巨桉(17 条 ARF 蛋白)、麻疯树(17 条 ARF 蛋白)、蓖麻(17 条 ARF 蛋白)构建系统发育树,其中水稻为单子叶植物的典型代表,拟南芥为双子叶植物的典型代表。进化树聚类分析结果(图 1)显示,油桐 ARF 家族成员可分为 I 亚族、II 亚族、III 亚族和 IV 亚族这 4 个亚族。其中 I 亚族中含有 6 个油桐 ARF 蛋白家族成员,分别为 VfARF2A、VfARF2B、VfARF1、VfARF24、VfARF9B、VfARF9A;II 亚族中含有 2 个油桐 ARF 蛋白家

族成员,分别为 VfARF4、VfARF3;III 亚族含有 5 个油桐 ARF 蛋白家族成员,分别为 VfARF5、VfARF6、VfARF8、VfARF19A、VfARF19B;IV 亚族含有 4 个油桐 ARF 蛋白家族成员,分别为 VfARF17、VfARF16B、VfARF10、VfARF16A。值得注意的是,在 I 亚族中,存在一个分支仅包含 EgrARF24、VfARF24 和 JcARF10。该分支没有草本一年生植物(如拟南芥、水稻)的 ARF 蛋白家族成员,但包含木本多年生植物(如巨桉、油桐、麻疯树)的 ARF 蛋白家族成员。研究结果表明,油桐与麻疯树和蓖麻之间存在较多的相似蛋白质,油桐的 ARF 蛋白均可在麻疯树和蓖麻中找到对应的同源蛋白质氨基酸序列。

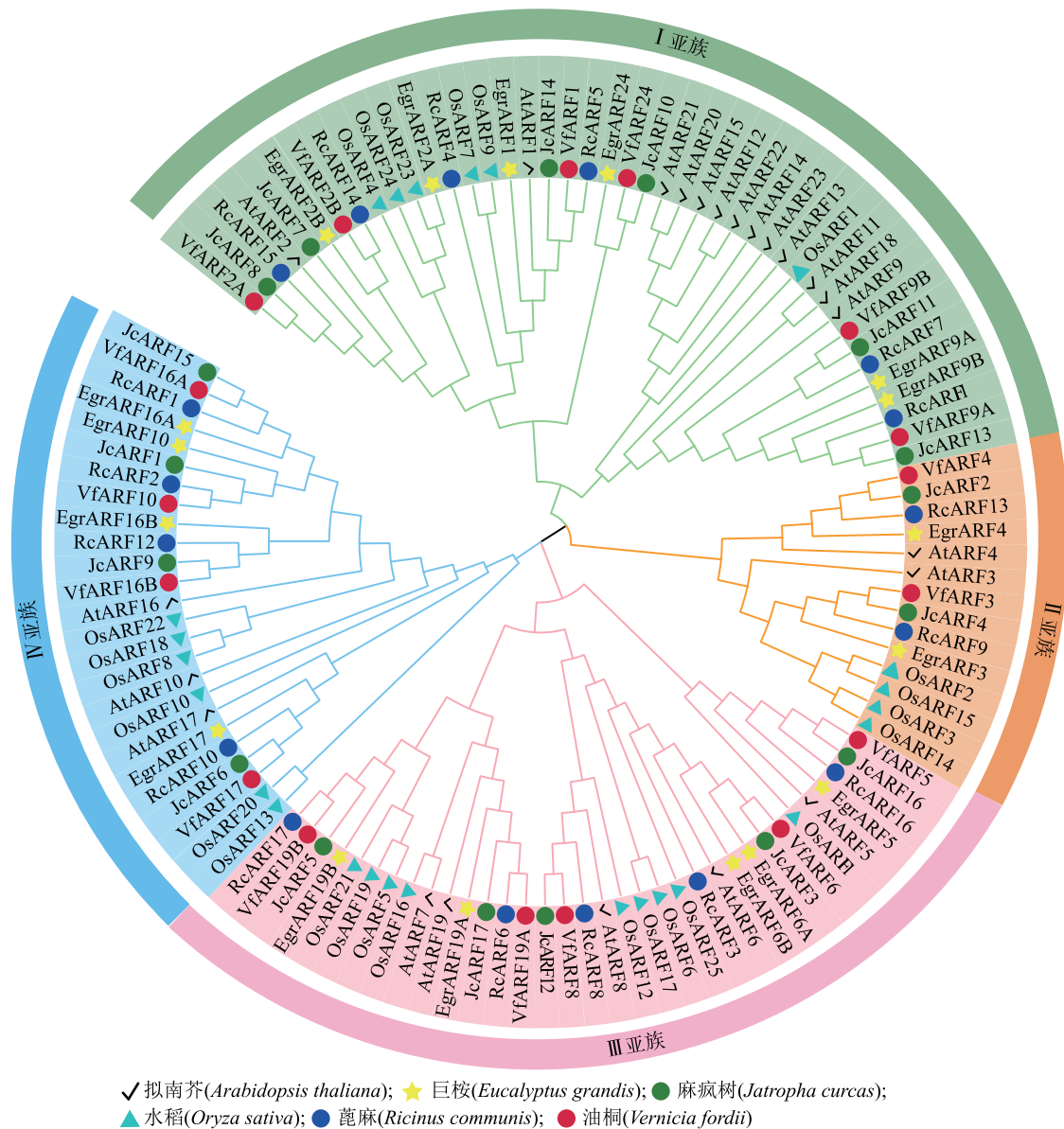


图 1 ARF 蛋白系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of ARF proteins

2.3 油桐 ARF 基因结构

将油桐 ARF 的 CDS 序列及其对应的基因序列按要求提交至在线网站 GSDS2.0 进行基因结构分析,由图 2 可知,油桐 ARF 基因结构复杂多样,均含

有较多的外显子与内含子。此外, *VfARF16A* 与 *VfARF16B* 基因结构上相似度较高, *VfARF19A* 与 *VfARF19B* 基因结构上相似度较高。

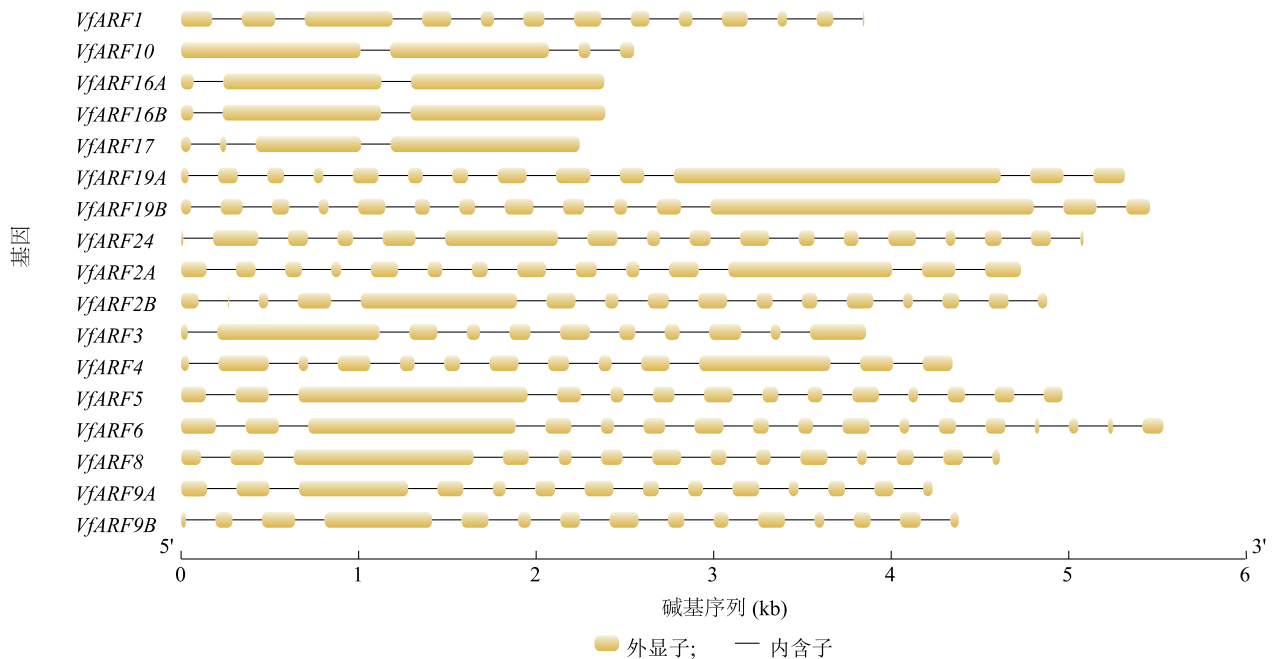


图 2 油桐 ARF 基因结构分析

Fig.2 Structure analysis of ARF gene in *Vernicia fordii*

2.4 油桐 ARF 蛋白保守基序

利用在线软件 MEME 预测油桐 ARF 蛋白质的保守结构域,结果如图 3 所示,亲缘关系较近的成员表现出相似的保守基序特征。*VfARF17* 含有 8 个保守基序, *VfARF1*、*VfARF3*、*VfARF9A*、*VfARF9B* 和 *VfARF10* 含有 9 个保守基序,其他序列均含有 10 个保守基序。油桐 ARF 蛋白都具有 6 个相同的 Motif, Motif 4、Motif 2、Motif 1、Motif 6、Motif 5、Motif 10。由此可推测,油桐 ARF 基因家族成员在功能上具有一定的相似性。

2.5 油桐 ARF 家族蛋白质保守结构域

油桐 ARF 家族蛋白质保守结构域分析结果见图 3 所示,可以看出,同一亚族蛋白质的保守结构域的组成和排序具有一定的相似性。Ⅰ亚族和Ⅱ亚族中,除 *VfARF2B* 和 *VfARF3* 编码的蛋白质含有 B3 和 Auxin_resp 2 个结构域外,其他成员均含有 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 3 个结构域,Ⅲ亚族中的全部成员均含有 B3 结构域、Auxin_resp 结构域和 AUX_IAA 结构域。此外,Ⅳ亚族中的全部成员均不包含 AUX_IAA

结构域,推测Ⅳ亚族的油桐 ARF 基因在进化历程中或许出现部分丢失现象。总的来看,大部分油桐 ARF 蛋白含有完整的 3 个结构域,即 B3 结构域、Auxin_resp 结构域和 AUX_IAA 结构域。各亚族的 ARF 蛋白保守结构域差别较小,所有油桐 ARF 蛋白均含有 B3 和 Auxin_resp 结构域。

2.6 油桐 ARF 基因家族成员的染色体定位

依据油桐基因组注释文件,结合 TBtools 分析油桐 ARF 基因的染色体定位,油桐 ARF 基因在各个染色体上的分布较均匀(表 1),17 个 *VfARF* 基因分布在 9 条染色体上,6 号和 8 号染色体上各有 3 个 *VfARF* 基因,1 号、2 号、4 号、5 号染色体上各有 2 个 *VfARF* 基因,3 号、7 号和 9 号染色体上各有 1 个 *VfARF* 基因。*VfARF10*、*VfARF4*、*VfARF1*、*VfARF16B*、*VfARF19B*、*VfARF2A* 位于染色体的上端, *VfARF16A*、*VfARF8*、*VfARF9B*、*VfARF24*、*VfARF9A*、*VfARF3*、*VfARF6*、*VfARF2B*、*VfARF19A*、*VfARF17*、*VfARF5* 位于染色体的下端。此外,在油桐 ARF 基因家族成员中未发现有串联重复和片段重复现象。

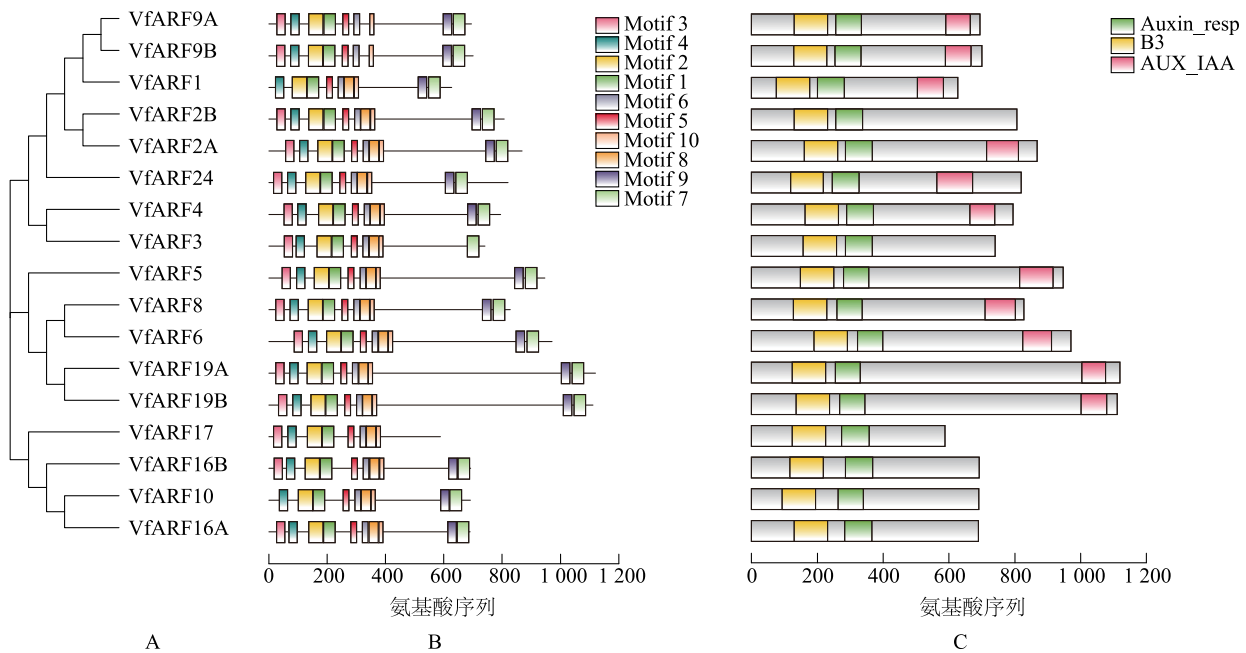


图3 油桐 *ARF* 系统进化树(A)、蛋白质保守基序(B)和保守结构域(C)分析

Fig.3 Phylogenetic tree (A), conserved motifs (B) and conserved domains (C) of *ARF* proteins in *Vernicia fordii*

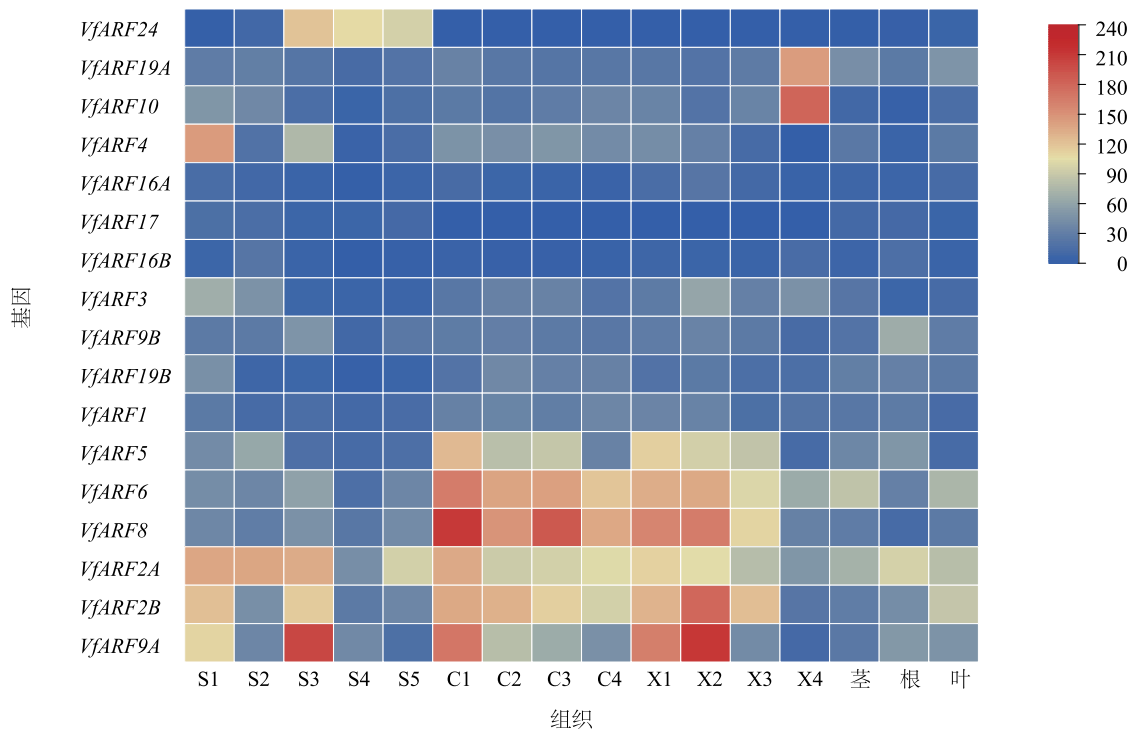
2.7 油桐 *ARF* 基因表达

由图4可知,在开花后10周,油桐种子中 *VfARF2A*、*VfARF9A*、*VfARF2B*、*VfARF4* 表达量较高。在开花后15周,油桐种子中 *VfARF2A* 的表达量最高。在开花后20周,油桐种子中 *VfARF9A* 的表达量最高。随着种子的生长和发育, *VfARF24* 基因表达量逐渐升高,但 *VfARF24* 基因在根、茎、叶、花中几乎不表达。在开花前30 d,雌蕾和雄蕾中 *VfARF5*、*VfARF6*、*VfARF8*、*VfARF9A*、*VfARF2A* 和 *VfARF2B* 表达量较高。在开花前20 d,雄蕾中 *VfARF6*、*VfARF8* 和 *VfARF2B* 表达量较高,雌蕾中 *VfARF6*、*VfARF8*、*VfARF2B*、*VfARF2A* 和 *VfARF9A* 表达量较高。在开花前10 d,雄蕾中 *VfARF6*、*VfARF8* 和 *VfARF2B* 表达量较高,雌蕾中 *VfARF6*、*VfARF8*、*VfARF2B* 表达量较高。推测这些基因可能与花器官的成熟与发育有关。*VfARF6* 和 *VfARF2A* 在茎部表达量较高。在根部, *VfARF2A* 和 *VfARF9B* 的表达量较高,其中 *VfARF2A* 的表达量最高,表明其可能参与调控根部生长和发育。叶片中 *VfARF2B*、*VfARF6*、*VfARF2A* 的表达量较高。值得注意的是, *VfARF19A* 和 *VfARF10* 仅在开花前1 d的雄蕾中表达量大幅上调,推测这2个基因可能与雄蕾后期的发育有关。油桐 *ARF* 基因在雌蕾和雄蕾中的表达量明显高于其在根、茎、叶

和种子中的表达量。此外, *VfARF16A*、*VfARF16B*、*VfARF17* 基因在油桐各组织中表达量都较低。综上所述, *ARF* 基因的表达在油桐不同组织中表现出了明显的组织特异性。

3 讨论

本研究通过对油桐全基因组进行生物信息学分析,鉴定出17个油桐 *ARF* 基因,这与麻疯树、巨桉和蓖麻的 *ARF* 基因家族成员数量一致。结合已报道的研究结果,发现 *ARF* 基因家族成员的数量在不同物种中有明显的差异,如拟南芥中有23个 *ARF* 基因^[23]、烟草(*Nicotiana tabacum*)中有50个 *ARF* 基因^[24]、水稻中有25个 *ARF* 基因^[25]、番茄中有21个 *ARF* 基因^[26]、大豆(*Glycine max*)中有51个 *ARF* 基因^[27]、苹果(*Glycine max*)中有29个 *ARF* 基因^[28]、桃(*Prunus persica*)中有18个 *ARF* 基因^[29]、葡萄中有19个 *ARF* 基因^[30]、南瓜(*Cucurbita moschata*)中有18个 *ARF* 基因^[31]、黄瓜(*Cucumis sativus*)中有15个 *ARF* 基因^[32]、茶树(*Camellia sinensis*)中有25个 *ARF* 基因^[33]、巨桉中有17个 *ARF* 基因^[34]、麻疯树中有17个 *ARF* 基因^[35]。尽管不同物种的基因组大小差异较大,但不同植物中 *ARF* 的数量与它们的基因组大小并无直接关系。



S1:开花后 10 周的种子;S2:开花后 15 周的种子;S3:开花后 20 周的种子;S4:开花后 25 周的种子;S5:开花后 30 周的种子;C1:开花前 30 d 的雌蕾;X1:开花前 30 d 的雄蕾;C2:开花前 20 d 的雌蕾;X2:开花前 20 d 的雄蕾;C3:开花前 10 d 的雌蕾;X3:开花前 10 d 的雄蕾;C4:开花前 1 d 的雌蕾;X4:开花前 1 d 的雄蕾。

图 4 油桐 ARF 基因表达量

Fig.4 Expression of ARF gene in *Vernicia fordii*

油桐 ARF 蛋白氨基酸序列长度为 587~1 119 aa,相对分子量为 64 510.90~124 993.45,均为酸性蛋白质。由于所有油桐 ARF 蛋白的不稳定系数>40,且亲水性指数<0,故它们均属于不稳定、易降解的亲水性蛋白。油桐 ARF 蛋白的亚细胞定位结果与其他物种略有不同,例如梅 (*Prunus mume*) PmARF17 蛋白位于细胞核和细胞膜上^[36],而油桐 ARF 蛋白仅存在细胞核中。染色体定位分析结果表明,油桐 ARF 基因在不同染色体上的数量分布较为均匀,17 个油桐 ARF 基因定位在 9 条染色体上,平均每条染色体上含有 1~3 个油桐 ARF 基因,并且在各染色体上均未发现串联重复和片段重复的情况。系统进化关系分析发现,油桐 ARF 家族成员可划分为 4 个亚族,这与拟南芥的亚族划分一致。其中 I 亚族是该家族中成员数量最多的一支,共有 6 个油桐 ARF 基因成员;II 亚族中含有的油桐 ARF 基因家族成员最少,仅有 2 个油桐 ARF 基因成员。分析油桐 ARF 基因及其编码蛋白质结构发现,油桐 ARF 均含有外显子和内含子且结构复杂多样,亲缘

关系较为密切的成员表现出相似的保守基序特征,这表明在物种进化过程中 ARF 存在一定的保守性。基因家族成员保守结构域分析结果显示,同一亚族的保守结构域的组成和排序往往呈现出相似的特征。油桐的大多数 ARF 蛋白都含有 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 结构域,仅少数的油桐 ARF 蛋白表现出不同于其他成员的 AUX_IAA 结构域缺失现象,这与黄贤斌等^[37]对石榴 (*Punica granatum*) ARF 蛋白家族的鉴定结果相似。值得注意的是,IV 亚族的所有成员均不包含 AUX_IAA 结构域,可以推测 IV 亚族的油桐 ARF 基因在进化历程中或许发生了部分丢失的现象。生长素/吲哚乙酸 (Aux/IAA) 蛋白质通常与 ARF 蛋白 C 末端的 AUX_IAA 结构域结合形成异源二聚体,进而参与生长素信号途径,发挥着生长素调控作用^[38]。据此推测油桐 ARF 蛋白的 AUX_IAA 结构域丢失可能会对其生理功能产生影响。

基因表达特征为基因功能研究提供重要信息。本研究发现部分油桐 ARF 基因在多种组织中皆高

表达,如 *VfARF5*、*VfARF6*、*VfARF8*、*VfARF9A*、*VfARF2A* 和 *VfARF2B*,暗示它们可能在油桐的生长发育中发挥着多方面的重要作用。部分基因在各组织中不表达或表达量过低,有些基因则主要在一个组织中表达量很高,表明 *ARF* 基因在油桐不同组织中的表达具有显著的组织特异性。此外,油桐 *ARF* 基因在雌蕾和雄蕾中的表达水平明显高于其在根、茎、叶和种子中的表达水平,石榴中也出现 *PgARF6a*、*RgARF6b*、*PgARF6c* 在花、花芽中较高表达现象^[6,39],表明在花器官的发育和成熟过程中 *ARF* 基因或将发挥重要作用。

本研究在油桐全基因组中共鉴定到 17 个油桐 *ARF* 基因,对其基因结构、系统发育、染色体定位及其编码蛋白质基本的理化性质、亚细胞定位、保守结构域、保守基序进行了系统的生物信息学分析。此外,基于油桐在不同发育阶段的花、种子和营养组织的转录组数据,对油桐 *ARF* 基因的表达特征开展了全面研究。本研究结果为阐释生长素响应因子 *ARF* 在油桐生长发育过程中的功能和作用机制提供了理论支持,同时也为研究其他植物中的植物生长素响应因子 *ARF* 提供参考信息。

参考文献:

- [1] 雷明豪,杨付明,胡泽华. 桐油在土家医外治法中的应用[J]. 中国民族民间医药,2019,28(21):54-56.
- [2] 杜洋文,邓先珍,曾幸福. 不同套种模式对油桐生长及其枝叶养分的影响[J]. 森林与环境学报,2015,35(3):255-260.
- [3] 李艳林,高志红,宋娟,等. 植物生长素响应因子 *ARF* 与生长发育[J]. 植物生理学报,2017,53(10):1842-1858.
- [4] WANG B, XUE J S, YU Y H, et al. Fine regulation of *ARF17* for anther development and pollen formation[J]. BMC Plant Biology, 2017(1):243.
- [5] ELLIS C M, NAGPAL P, YOUNG J C, et al. Auxin response factor1 and auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development,2005,132(20):4563-4574.
- [6] NAGPAL P, ELLIS C M, WEBER H, et al. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation[J]. Development,2005,132(18):4107-4118.
- [7] 袁苗,刘鑫,党仕卓,等. 红地球葡萄生长素响应因子 *VvARF7* 基因克隆及其光响应分析[J]. 江苏农业学报,2023,39(4):1052-1061.
- [8] HU W, ZUO J, HOU X W, et al. The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress[J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:742.
- [9] BOUZROUD S, GASPARINI K, HU G, et al. Down regulation and loss of auxin response factor 4 function using crispr/cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress[J]. Genes,2020,11(3):272.
- [10] LIU N, DONG L, DENG X, et al. Genome-wide identification, molecular evolution, and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in *Brachypodium distachyon* L.[J]. BMC Plant Biology,2018,18(1):336.
- [11] ZHANG L, LIU M, LONG H, et al. Tung tree (*Vernicia fordii*) genome provides a resource for understanding genome evolution and improved oil production[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics,2019,17(6):558-575.
- [12] MARCO P, COGGILL P C, EBERHARDT R Y, et al. The Pfam protein families database[J]. Nucleic Acids Research,2012,40:290-301.
- [13] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching[J]. Nucleic Acids Research,2011,39:29-37.
- [14] SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. PNAS,1998,95(11):5857-5864.
- [15] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins[J]. Nucleic Acids Research,2011,39:225-229.
- [16] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]// WALKER J M. The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press,2005:571-607.
- [17] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. Nucleic Acids Research,2007,35(2):585-587.
- [18] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution,2021,38(7):3022-3027.
- [19] HU B, JIN J, GUO Y, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics,2015,31(8):1296-1297.
- [20] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research,2009,37(2):202-208.
- [21] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant,2020,13(8):1194-1202.
- [22] LIU W, YI Y, ZHUANG J, et al. Genome-wide identification and transcriptional profiling of the basic helix-loop-helix gene family in tung tree (*Vernicia fordii*)[J]. PeerJ,2022,10:e13981.
- [23] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE P J, ARIMA K, et al. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*[J]. Plant Cell,2005,17(2):444-463.

- [24] 孙亭亭,张磊,陈乐,等. 普通烟草 *ARF* 基因家族序列的鉴定与表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(1):162-168.
- [25] WANG D, PEI K, FU Y, et al. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. Gene,2007,394(1/2):13-24.
- [26] WU J, WANG F Y, CHENG L, et al. Identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) genes in *Solanum lycopersicum* [J]. Plant Cell Reports,2011,30(11):2059-2073.
- [27] HA C V, LE D T, NISHIYAMA R, et al. The auxin response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress [J]. DNA Research,2013,20(5):511-524.
- [28] 李慧峰,冉昆,何平,等. 苹果生长素响应因子 (ARF) 基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. 植物生理学报,2015,51(7):1045-1054.
- [29] LI H, RAN K, SUN Q. Genome-wide identification and expression analysis of peach auxin response factor gene families [J]. Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology,2012,5(4):349-357.
- [30] WAN S B, LI W L, ZHU Y Y, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the auxin response factor gene family in *Vitis vinifera* [J]. Plant Cell Reports,2014,33(8):1365-1375.
- [31] 袁敬平,申长卫,陈碧华,等. 南瓜生长素响应因子 (ARF) 基因家族的全基因组分析及表达分析[J]. 植物生理学报,2020,56(11):2383-2396.
- [32] LIU S Q, HU L F. Genome-wide analysis of the auxin response factor gene family in cucumber [J]. Genetics & Molecular Research,2013,12(4):4317-4331.
- [33] 田时雨,张蓓林,雷阳,等. 茶树全基因组生长素反应因子 (ARF) 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 中国茶叶,2022,44(6):37-46.
- [34] YU H, SOLER M, MILA I, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of the auxin response factor (ARF) gene family in *Eucalyptus grandis* [J]. PLoS One,2014,9(9):e108906.
- [35] TANG Y, BAO X, LIU K, et al. Genome-wide identification and expression profiling of the auxin response factor (ARF) gene family in *Physic nut* [J]. PLoS One,2018,13(8):e0201024.
- [36] 李艳林, IQBAL S, 侍婷, 等. 梅 *PmARF17* 克隆及其在花发育中与内源激素的调控模式 [J]. 中国农业科学,2021,54(13):2843-2857.
- [37] 黄贤斌,张太奎,刘翠玉,等. 石榴 *ARF* 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 果树学报,2019,36(1):43-55.
- [38] 梅梅,王晓禹,张晓林,等. 植物生长素响应因子 ARF 研究进展 [J]. 种子,2017,36(1):47-54.
- [39] WU M F, TIAN Q, REED J W. *Arabidopsis microRNA167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression and regulates both female and male reproduction [J]. Development,2006,133(21):4211-4218.

(责任编辑:成纾寒)