

# 石榴 ARF 基因家族鉴定及表达分析

黄贤斌<sup>1,2</sup>, 张太奎<sup>1,2</sup>, 刘翠玉<sup>1,2</sup>, 赵玉洁<sup>1,2</sup>, 魏洪珉<sup>1,2</sup>, 周润青<sup>1,2</sup>, 苑兆和<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; <sup>2</sup>南京林业大学林学院, 南京 210037)

**摘要:**【目的】筛选并分析石榴生长素响应因子(auxin response factor, ARF)基因家族,为解析石榴 ARF 基因功能及信号转导调控机制的研究提供参考。【方法】利用生物信息学工具,系统地分析石榴 ARF 基因家族成员的基因结构、蛋白理化性质、蛋白结构、保守基序、系统进化和 RNA-Seq 数据。【结果】石榴全基因组中鉴定出 19 个可能的 ARF 家族基因,根据系统发育树可以划分为 4 类。PgARF 基因家族成员的扩张与全基因组复制事件有关,存在串联重复现象。RNA-Seq 数据分析表明, PgARF 有一定的组织表达特异性,存在假基因化和新功能化的可能。【结论】整合以上基因结构、系统发育与进化、RNA-Seq 表达等分析结果,发现石榴 ARF 蛋白具有典型的 B3、Auxin\_resp 结构域,多数还具有 Aux/IAA 结构域。石榴 ARF 基因家族基因结构和保守基序的进化与进化时间相关,同时家族成员扩张主要与全基因组复制事件相关。

**关键词:**石榴; ARF 基因家族; 进化分析; 表达分析

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2019)01-0043-13

## Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in *Punica granatum*

HUANG Xianbin<sup>1,2</sup>, ZHANG Taikui<sup>1,2</sup>, LIU Cuiyu<sup>1,2</sup>, ZHAO Yujie<sup>1,2</sup>, WEI Hongmin<sup>1,2</sup>, ZHOU Jianqing<sup>1,2</sup>, YUAN Zhaohe<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Co-innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; <sup>2</sup>College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** 【Objective】 Auxin response factor (*ARF*) is an essential plant-specific transcription factor (TF) which can identify and combine the auxin response elements. It participates in auxin signal transduction and regulates the auxin responses. Generally, the majority of ARF proteins consist of three typical conserved domains: a DNA binding domain (DBD) in the N terminal region, a middle region (MD) and a C-terminal dimerization domain (CTD). Pomegranate (*Punica granatum*) is widely cultivated as a functional and emerging fruit tree. Although there is an increasing trend for pomegranate market and cultivated area, there is still a gap in the understanding of its growth and development regulation. *ARF* transcription factor genes are the central element mediating plant development. Hence, we performed the genome-wide analysis of *ARF* transcription factor gene family in pomegranate to provide sequence resource for further functional verifications. 【Methods】 In order to identify *ARF* gene family genome-wide, the pomegranate genomic and transcriptomic data were downloaded from NCBI. HMMER v3.1 software was used to blast the putative *ARF* candidate genes in pomegranate genome with the HMM profile of the Auxin\_resp domain (PF06507) as a query. After identification of the conserved domains, the invalid and redundant sequences were deleted. The ARF protein sequences of *Arabidopsis thaliana* and *Eucalyptus grandis* were obtained from TAIR database and Plant Transcription Factor Database

收稿日期: 2018-05-04 接受日期: 2018-09-21

基金项目: 南京林业大学高层次人才科研启动基金(GXL2014070); 南京林业大学优秀博士学位论文创新基金; 江苏省普通高校研究生科研创新计划(KYLX16\_0857); 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者简介: 黄贤斌, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树发育生物学。Tel: 18752020676, E-mail: xianbin\_huang8@163.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: zhyuan88@hotmail.com

(PlantTFDB), respectively. This estimation of the pomegranate ARF protein sequence was analyzed using the Protparam software. The molecular weight, theoretical pI, instability index and grand average of hydropathicity were estimated. The positions and numbers of introns and exons of the *PgARF* genes were detected using the Gene Structure Display Server (GSDS v2.0). Phylogenetic analysis was performed by MEGA v7.0 program with the neighbor-joining (NJ) method and 1 000 bootstrap replicates. The conserved motifs and domains of the *PgARF* protein sequences were predicted by the Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) and Prosite software, respectively. DNAMAN v8.0 was used for multiple sequence alignments in pomegranate ARF proteins. The protein secondary structure and tertiary structure of the pomegranate ARF proteins were analyzed by SSPro v4.0 and SWISS-MODEL. To elucidate the tissue-specific expression pattern of *PgARF* genes, the Kallisto tool was employed to quantify the *ARF* gene expression levels with the pomegranate RNA-Seq data.【Results】A total of 19 putative *ARF* candidate genes were identified in pomegranate genome. This estimation of the pomegranate ARF proteins indicated that their molecular weight ranged from 61.59 to 124.23 ku with a pIs ranging from 5.35 to 8.86, and all of them were labile and hydrophobic proteins. A NJ phylogenetic tree was constructed using the ARF proteins of pomegranate, *A. thaliana* and *E. grandis*, and clustered ARFs into four classes (Class I, II, III and IV). The structure analysis of the pomegranate *ARF* genes indicated that the intron number varied from 1 to 13 and the exon number varied from 2 to 14. Integrated phylogenetic and gene structure analyses deciphered that the exons have been split due to the recent intron insertion. Phylogenetic analyses showed an *ARF* gene number ratio (1:1:1) for *A. thaliana* versus *E. grandis* versus pomegranate except for the *A. thaliana*-lineage-specific clade in Class III. It was inferred to be related with the paleohexaploidy event. Similarly, a ratio (1:2:2) for *A. thaliana* versus *E. grandis* versus pomegranate was found in several groups of Clades III and IV. It was inferred to be related with the paleotetraploidy event. Hence, the paleohexaploidy and paleotetraploidy events in pomegranate genome contributed to the expansion of the *PgARF* gene. The phylogenetic and genomic location analyses indicated a tandem duplication of *PgARF16a* and *PgARF16b*. Motif and sequence alignment analyses suggested that the B3, Auxin\_resp and Aux/IAA domain of the *PgARF* proteins were highly conserved. The motif 4 and motif 5 belonged to the B3 domain; motif 7 and motif 8 belonged to the Auxin\_resp domain; motif 11 and motif 12 belonged to Aux/IAA domain. The secondary and tertiary structure analysis showed that the helixes were the major part of the ARF protein. The roles of *PgARF* in the development of pomegranate leaves and flower tissues were inferred from the homologous genes *AtARF* in *A. thaliana*. The RNA-Seq expression profile suggested that most of the *PgARF* genes were highly expressed in root, leaf, flower, floral bud, fruit, inner seed coat, outer seed coat and peel. *PgARF4b* was lowly expressed in the inner seed coat, and *PgARF5* highly expressed in the outer seed coat. These results suggested tissue-specific expression patterns of *ARF* family genes. Compared with the other *ARF* genes, *PgARF3a* had a very weak expression. This might be related to the pseudogenization of *PgARF3a* resulting in the gene inactivation. Conversely, distinct results were found in *PgARF24* which were highly expressed in all tissues. It inferred to be related with the neofunctionalization.【Conclusion】The integration of the gene structure, phylogentic, evolutionary and expression analyses provided a genome-wide trait and expression pattern of *ARF* in pomegranate. The results provide a reference for further function verifications and auxin signal transduction pathway regulation of *PgARF* genes.

**Key words:** *Punica granatum*; Auxin response factor gene family; Phylogenetic analysis; Expression analysis

生长素(auxin)是植物中重要的生长调节物质,几乎参与了植物的整个生长发育过程<sup>[1-2]</sup>。生长素与植物细胞的分裂分化和伸长、根茎的形态建成、维管组织的形成和分化、器官衰老、顶端优势、向性运动及应对外界压力等方面密切相关<sup>[3-6]</sup>。生长素在调节植物生长和发育的过程中,通过改变早期反应基因的表达,如 Aux/IAA、GH3、SAUR 基因家族,在调节植物生长和发育方面起着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。这些基因的共同特点是,在基因的启动子区域均含有由 6 个碱基组成的被称为生长素应答元件(auxin response elements, AuxRE)的顺式作用元件(TGTCTC)<sup>[9]</sup>。而生长素响应因子(auxin response factor, ARF)就是一类能够特异性识别并结合生长素应答元件,参与生长素信号转导,调节生长素响应因子表达的转录因子<sup>[10-11]</sup>。

多数的 ARF 蛋白一般都包含 3 个保守结构域,即 N 末端 B3 DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD)、Auxin\_resp 结构域和 C 末端 Aux/IAA 结构域(二聚化结构域,CTD)。B3 DNA 结合域能直接与生长素调控的下游基因启动子区的 AuxREs 结合,Auxin\_resp 结构域是具有转录激活或抑制活性的中心功能区,Aux/IAA 结构域参与调节 ARFs 与 AuxREs 的结合并调控下游生长素响应基因的表达<sup>[3,10]</sup>。ARF 蛋白主要在植物生长过程中与 AuxRE 结合发挥催化作用,或者是与生长素结合从而抑制其与 AuxRE 结合达到抑制作用<sup>[12]</sup>。在这些 ARF 家族成员中部分基因的功能已被验证,如 *AtARF1* 和 *AtARF2* 突变会影响拟南芥雌蕊的生长模式,参与叶片的衰老、花器官的发育与凋谢过程<sup>[13-14]</sup>。而 *AtARF3* 和 *AtARF4* 在植物的生殖和营养生长中发挥了重要作用<sup>[15-16]</sup>。*AtARF5*(MONOPTEROS)在维管组织的形成、胚发育模式的建成中起着关键的作用<sup>[17-19]</sup>。*AtARF6* 和 *AtARF8* 参与调节花器官的发育程度,影响胚珠的发育,并调控逆境胁迫相关茉莉酸的合成,*AtARF8* 还调节下胚轴的伸长以及根的生长<sup>[20-22]</sup>。*ARF7/ARF19* 与 *AtIAA1*、*AtLBD16/18/29* 等基因一起介导了拟南芥侧根发育的调控网络,在缺少 *ARF7/ARF19* 的情况下,*LBD16/ASL18* 和 *LBD29/ASL16* 的过度表达会导致侧根的形成<sup>[12,23-26]</sup>。

石榴(*Punica granatum*)为千屈菜科(Lythraceae)石榴属(*Punica*)果树,也是世界范围内广泛栽培的重要经济果树之一<sup>[27-29]</sup>。研究石榴 ARF 家族基因

的功能和调控机制,有助于调控石榴的生长模式以及花和果实的发育。石榴全基因组测序的完成以及数据的公布,为石榴基因功能的研究提供了重要的数据支持<sup>[30-34]</sup>。笔者通过生物信息学手段鉴定石榴 ARF 家族基因,并进行基因结构、蛋白保守结构域、分子进化以及 RNA-Seq 分析,为石榴 ARF 家族基因的克隆及功能研究、探索 ARF 影响植物生长发育的调控机制提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 基因组和转录组数据来源

石榴全基因组数据(ASM220158v1)<sup>[30]</sup>、转录组数据均下载于 NCBI,拟南芥 ARF 蛋白序列下载于拟南芥数据库(<http://www.arabidopsis.org>),巨桉 ARF 蛋白序列下载于 PlantTFDB 数据库<sup>[35]</sup>(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn>)。

### 1.2 石榴 ARF 基因家族成员的鉴定及序列分析

从 Pfam 数据库中下载 ARF 基因家族的序列比对文件(PF06507)<sup>[36]</sup>后,通过 HMMER v3.1b1 软件<sup>[37]</sup>将比对文件转换为 HMM 模型文件,使用 SelectHMM<sup>[34]</sup>(<https://github.com/Redpome/SelectHMM>)筛选石榴蛋白序列中含有 ARF 结构域的序列(E-value $\leq 10^{-10}$ )。然后使用 CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)检测其蛋白结构域,除去不含 ARF 结构域和结构域不完整的序列<sup>[38-39]</sup>。

利用在线软件 ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)预测石榴 ARF 蛋白的理化性质,包括分子质量、等电位、亲水性、不稳定系数等<sup>[40]</sup>。利用 SignalP4.1 Sever(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)进行信号肽预测。并将石榴 ARF 基因比对拟南芥数据库获得拟南芥的同源基因,为石榴 ARF 家族成员的基因功能预测提供参考。

### 1.3 系统进化树的构建

利用 Clustal W 将候选蛋白与拟南芥、巨桉 ARF 基因家族蛋白进行多序列比对,使用 MEGA 7.0<sup>[41]</sup>软件,采用 NJ 法(neighbor-joining)(Bootstrap=1 000)进行系统进化树的构建。

### 1.4 石榴 ARF 基因家族基因结构分析

根据所得石榴 ARF 基因蛋白序列和基因序列,利用 Perl 脚本解析得到石榴 ARF 基因家族的基因结构信息,包括内含子、外显子以及上下游序列。并

利用在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 分析其基因结构<sup>[42]</sup>。

### 1.5 石榴 ARF 蛋白结构及保守基序分析

使用在线软件 ProSite (<https://prosite.expasy.org>)<sup>[43]</sup> 分析石榴 ARF 蛋白序列, 得到每个石榴 ARF 蛋白对应的 B3 结合结构域、Auxin\_resp 结构域和 Aux/IAA 结构域的位置信息。用 MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme-in.tro.html>) 分析得到石榴 ARF 的 motif 模式, 以此对石榴 ARF 基因蛋白保守基序进行分析<sup>[44]</sup>。为进一步获取 Auxin\_resp 结构域的具体情况, 用生物信息学软件 DNAMAN 8.0 对石榴 ARF 基因家族成员的蛋白结构域进行多重比

对。最后, 利用在线软件 SSPro 4.0 (<http://download.igb.uci.edu/sspro4.html>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 分析石榴 ARF 蛋白的高级结构。

### 1.6 石榴 ARF 基因家族的 RNA-Seq 分析

从 NCBI 数据库中下载与石榴生长发育有密切关系的组织器官 RNA-Seq 数据, 包括根、新鲜叶片、成熟花、花芽、成熟果实、内种皮、外种皮、根茎叶果混合样、授粉后 50 d 的果皮、授粉后 95 d 的果皮和授粉后 140 d 的果皮, 详情见表 1。利用 Kallisto v0.43.1 软件<sup>[45]</sup> 对转录组数据表达差异进行分析, 将所得的差异数据进行  $\text{Log}_2(\text{TPM}+1)$  转换, 最后用 R

表 1 石榴转录组测序数据

Table 1 RNA-Seq data of pomegranate

登录号 Accession No.	石榴品种 Pomegranate cultivars	样品类型 Sample type	测序文库 Library	数据量 Data size/Gb	测序平台 Platform	参考文献 Reference	备注 Note
SRR5279396	大笨子 Babenzi	根 Root	双末端 Paired end	6.5	Illumina HiSeq 4000	[30]	-
SRR5279397	大笨子 Babenzi	叶 Leaf	双末端 Paired end	6.8	Illumina HiSeq 4000	[30]	-
SRR5279395	大笨子 Babenzi	花 Flower	双末端 Paired end	6.8	Illumina HiSeq 4000	[30]	雌蕊可育花 Female-fertile flowers
SRR5446599	突尼斯软籽 Tunisia	花芽 Flower bud (13.1~25.0 mm)	双末端 Paired end	6.4	Illumina HiSeq 2500	[46]	雌蕊败育花 Female sterility flowers
SRR6024695	Wonderful	成熟果皮 Mature pericarp	双末端 Paired end	6.4	Illumina HiSeq 2000	[32]	-
SRR5678820	突尼斯软籽 Tunisia	授粉 50 d 后的外种皮 Outer seed coat (50 days after pollination)	双末端 Paired end	7.3	Illumina HiSeq 4000	[30]	-
SRR5279388	大笨子 Dabenzi	授粉 50 d 后的内种皮 Inner seed coat (50 days after pollination)	双末端 Paired end	9.3	Illumina HiSeq 2000	[30]	-
SRR1054190	Black127	根叶花果混合样 Mixed samples of root, leaf, flower and fruit	单末端 Single end	1.2	454 GS FLX Titanium	[33]	-
SRR5279394	大笨子 Dabenzi	授粉 50 d 后的果皮 Pericarp (50 days after pollination)	双末端 Paired end	8.2	Illumina HiSeq 2000	[30]	-
SRR5279393	大笨子 Dabenzi	授粉 95 d 后的果皮 Pericarp (95 days after pollination)	双末端 Paired end	7.5	Illumina HiSeq 2000	[30]	-
SRR5279392	大笨子 Dabenzi	授粉 140 d 后的果皮 Pericarp (140 days after pollination)	双末端 Paired end	7.3	Illumina HiSeq 2000	[30]	-

绘制石榴 ARF 基因家族的表达热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 石榴 ARF 基因家族成员的鉴定及序列分析

从 Pfam 数据库中下载 ARF 基因家族的序列比对文件 (PF06507), 将比对文件转换格式后, 用 Se-

lectHMM (<https://github.com/Redpome/SelectHMM>) 筛选石榴蛋白序列中含有该结构域的序列, 基于 E-value  $\leq 10^{-10}$ 。一共从基因组中鉴定出可能的 21 个石榴 ARF 基因家族候选成员, 但其中有 2 个 (CDL15\_Pgr010921 和 CDL15\_Pgr016635) 因不含有 ARF 保守结构域或结构序列不完整被除去, 因此最

终鉴定出19个可能的石榴ARF基因家族成员。将石榴ARF基因家族成员与模式植物拟南芥进行同源比对分析后,寻找拟南芥中的直系同源基因,按照

最匹配的结果来对石榴ARF基因家族成员进行排序命名,详情见表2。

通过ExPASy在线工具,对石榴ARF基因家族

表2 石榴ARF基因家族的基本信息

Table 2 The basic information of ARF gene family in pomegranate

基因名称 Gene name	基因登录号 Gene ID	外显子数 Exon No.	蛋白长度 Protein length/aa	蛋白分子质量 Molecular weight/ku	理论等电点 pI	不稳定系数 Instability index	亲疏水性均值 GRAVY	保守结构域 Conserved domains	拟南芥同源基因 AT homologous gene		E值 E-value
									登录号 Accession No.	基因名称 Gene Name	
<i>PgARF1</i>	CDL15_Pgr003477	14	673	74.96	6.44	55.78	-0.497	B3, ARF, Aux/IAA	At1G59750.1	<i>AtARF1</i>	0
<i>PgARF2</i>	CDL15_Pgr024559	13	814	90.83	6.07	63.24	-0.533	B3, ARF, Aux/IAA	At5G62000.1	<i>AtARF2</i>	0
<i>PgARF3a</i>	CDL15_Pgr002591	9	556	61.84	8.4	43.44	-0.380	B3, ARF	At2G33860.1	<i>AtARF3</i>	5.75e-153
<i>PgARF3b</i>	CDL15_Pgr016800	10	690	75.61	6.77	50.29	-0.457	B3, ARF	At2G33860.1	<i>AtARF3</i>	2e-101
<i>PgARF4a</i>	CDL15_Pgr025066	12	756	83.93	6.23	56.67	-0.435	B3, ARF, Aux/IAA	At5G60450.1	<i>AtARF4</i>	0
<i>PgARF4b</i>	CDL15_Pgr028163	12	756	82.74	5.59	64.66	-0.394	B3, ARF	At5G60450.1	<i>AtARF4</i>	0
<i>PgARF5</i>	CDL15_Pgr006935	14	906	99.69	5.35	57.37	-0.381	B3, ARF, Aux/IAA	At1G19850.1	<i>AtARF5</i>	0
<i>PgARF6a</i>	CDL15_Pgr006106	14	882	97.09	6.03	66.79	-0.386	B3, ARF, Aux/IAA	At1G30330.1	<i>AtARF6</i>	0
<i>PgARF6b</i>	CDL15_Pgr001366	14	966	107.09	6.35	74.57	-0.526	B3, ARF, Aux/IAA	At1G30330.1	<i>AtARF6</i>	0
<i>PgARF6c</i>	CDL15_Pgr002968	14	868	96.37	6.18	61.72	-0.452	B3, ARF, Aux/IAA	At1G30330.1	<i>AtARF6</i>	0
<i>PgARF9a</i>	CDL15_Pgr018027	14	678	76.00	5.85	56.03	-0.524	B3, ARF, Aux/IAA	At4G23980.1	<i>AtARF9</i>	0
<i>PgARF9b</i>	CDL15_Pgr027988	13	677	75.87	6.24	58.84	-0.540	B3, ARF, Aux/IAA	At4G23980.1	<i>AtARF9</i>	0
<i>PgARF10</i>	CDL15_Pgr025089	4	682	74.71	8.86	52.71	-0.288	B3, ARF	At2G28350.1	<i>AtARF10</i>	0
<i>PgARF16a</i>	CDL15_Pgr025561	3	690	75.78	8.45	45.11	-0.441	B3, ARF	At4G30080.1	<i>AtARF16</i>	0
<i>PgARF16b</i>	CDL15_Pgr026045	3	676	74.46	6.77	52.99	-0.439	B3, ARF	At4G30080.1	<i>AtARF16</i>	0
<i>PgARF17</i>	CDL15_Pgr006519	2	568	61.59	5.71	56.20	-0.235	B3, ARF	At1G77850.1	<i>AtARF17</i>	8.48e-171
<i>PgARF19a</i>	CDL15_Pgr009308	13	1111	124.23	6.42	76.32	-0.668	B3, ARF, Aux/IAA	At1G19220.1	<i>AtARF19</i>	0
<i>PgARF19b</i>	CDL15_Pgr015937	14	1126	124.12	6.22	59.75	-0.550	B3, ARF, Aux/IAA	At1G19220.1	<i>AtARF19</i>	0
<i>PgARF24</i>	CDL15_Pgr010226	14	630	70.89	8.37	56.32	-0.364	B3, ARF, Aux/IAA	-	-	-

进行理化性质分析。分析结果显示,19个PgARF基因编码区长度为1 671 bp (*PgARF3*)~3 381 bp (*PgARF19b*), ARF蛋白的氨基酸长度为556 aa (*PgARF3*)~1 126 aa (*PgARF19b*), 蛋白分子质量为61.59 ku (*PgARF17*)~124.23 ku (*PgARF19a*)。其等电位范围从5.35 (*PgARF5*)到8.86 (*PgARF10*)不等, 其中有4个PgARF基因蛋白pI大于7, 偏碱性; 其余15个PgARF蛋白的pI均小于7, 偏酸性。PgARF蛋白的不稳定系数均大于43, 因此根据Puraprasad方法表明PgARF蛋白均是不稳定蛋白; 而亲水性分析表明PgARF基因都是亲水基因。PgARF基因的外显子数2~14, 其中有8个PgARF有14个外显子。除*PgARF3a*、*PgARF3b*、*PgARF4b*、*PgARF10*、*PgARF16a*、*PgARF16b*、*PgARF17*这7个蛋白只含有B3和Auxin\_resp结构域外, 其余10个PgARF均含有B3、Auxin\_resp和Aux/IAA结构域。而信号肽预测结果表明, 19条可能的石榴ARF蛋白均不存在信号肽, 属于非分泌型蛋白。

2.2 石榴ARF基因家族基因结构及系统发育树分

析

为了研究PgARF基因的系统进化关系, 利用PgARF蛋白全长序列构建系统进化树(图1-A)。据分析, 19个PgARF基因形成了6个旁系同源基因, 即*PgARF3a*和*PgARF3b*、*PgARF4a*和*PgARF4b*、*PgARF6b*和*PgARF6c*、*PgARF9a*和*PgARF9b*、*PgARF16a*和*PgARF16b*、*PgARF19a*和*PgARF19b*, 其中除*PgARF16a*和*PgARF16b*这个旁系同源基因外, 其余5对基因支持率均为100%。这说明了所构建的系统发育树稳健, 5对PgARF基因的基因序列相似, 亲缘关系非常接近。

为研究PgARF基因结构的特征, 用在线软件GSDS 2.0分析其基因结构(图1-B)。结构分析表明, PgARF基因家族成员的基因结构复杂多变, 不同的PgARF基因所含外显子和内含子数量差异很大, 外显子数为2~14, 内含子数为1~13。绝大多数的PgARF外显子数都在9个以上, 其中有8个PgARF有14个外显子, 同时有7个PgARF有5'上游和3'下游序列, 外显子数随着系统进化树由外端分

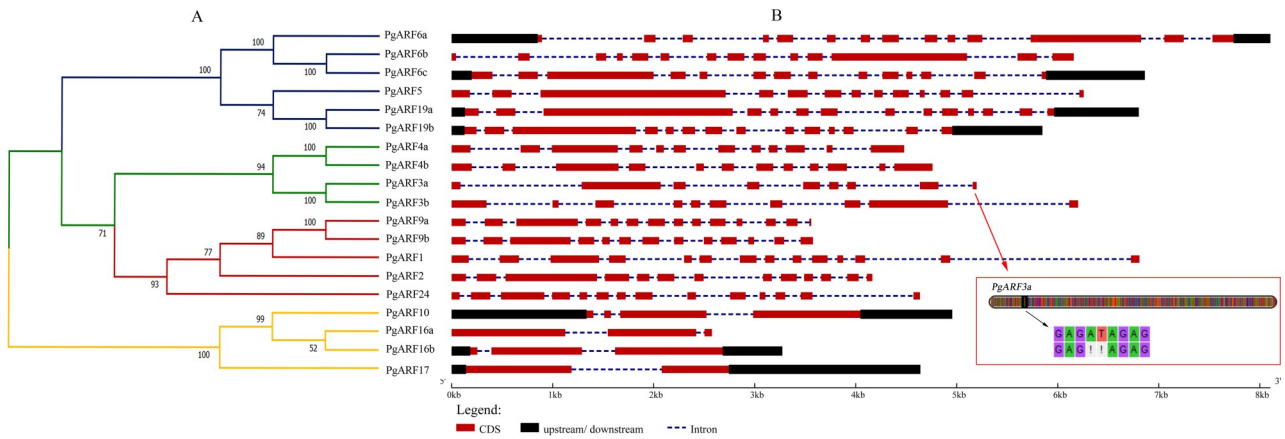


图 1 石榴 ARF 基因家族系统进化树(A)和基因结构(B)

Fig. 1 Phylogenetic tree (A) and gene structures (B) of pomegranate ARF gene family

支到内部分支逐渐增多。通过对PgARF系统进化树以及 Scaffold 定位分析,发现仅 *PgARF16a*(scaffold70)与 *PgARF16b*(scaffold70)存在串联重复现象。

为进一步探究PgARF基因家族的进化关系,构

建了石榴(19个ARF基因)、拟南芥(23个ARF基因)和巨桉(17个ARF基因)的ARF基因家族系统进化树(图2)。根据进化树的分支,可将ARF基因分为4类,分别为Class I、II、III和IV,其中Class I有6个PgARF基因,Class II有4个PgARF基因,Class

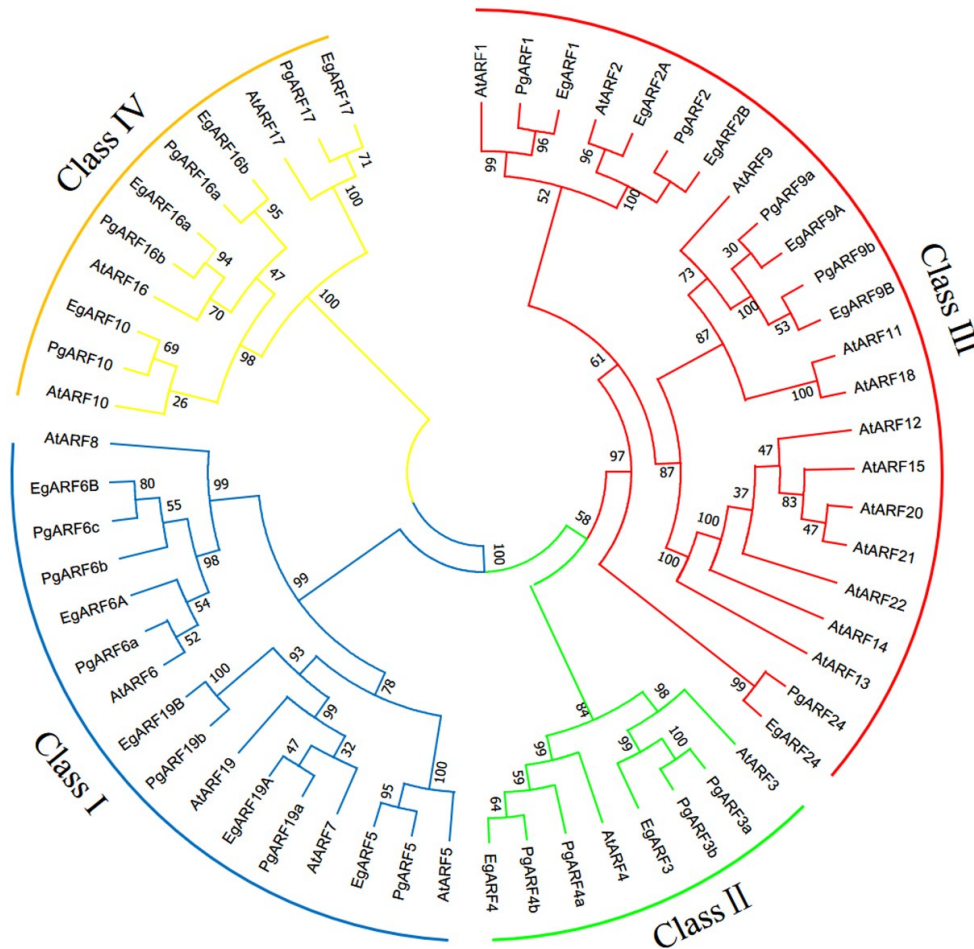


图 2 石榴与拟南芥、巨桉 ARF 基因家族的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of ARF gene family in pomegranate, *Arabidopsis* and *E. grandis*

III有5个PgARF基因,Class IV有4个PgARF基因,在Class III中存在着7个拟南芥种特异性分支。

### 2.3 石榴ARF蛋白结构及保守基序分析

通过CDD和SMART在线分析PgARF蛋白结构域位置信息,利用在线软件ProSite的MyDomains功能并结合系统发育树进行绘图(图3)。结果表明,PgARF均含有B3和Auxin\_resp结构域,约63%

的PgARF含有Aux/IAA结构域。Class I和Class III的PgARF基因家族成员均含有B3、Auxin\_resp和Aux/IAA结构域,而Class II和Class IV基因家族成员只含有B3、Auxin\_resp结构域(*PgARF4a*除外)。Class II的*PgARF4b*的旁系同源基因*PgARF4a*存在Aux/IAA结构域;*PgARF1*有2个Aux/IAA结构域。

为进一步分析PgARF蛋白的保守结构域分布

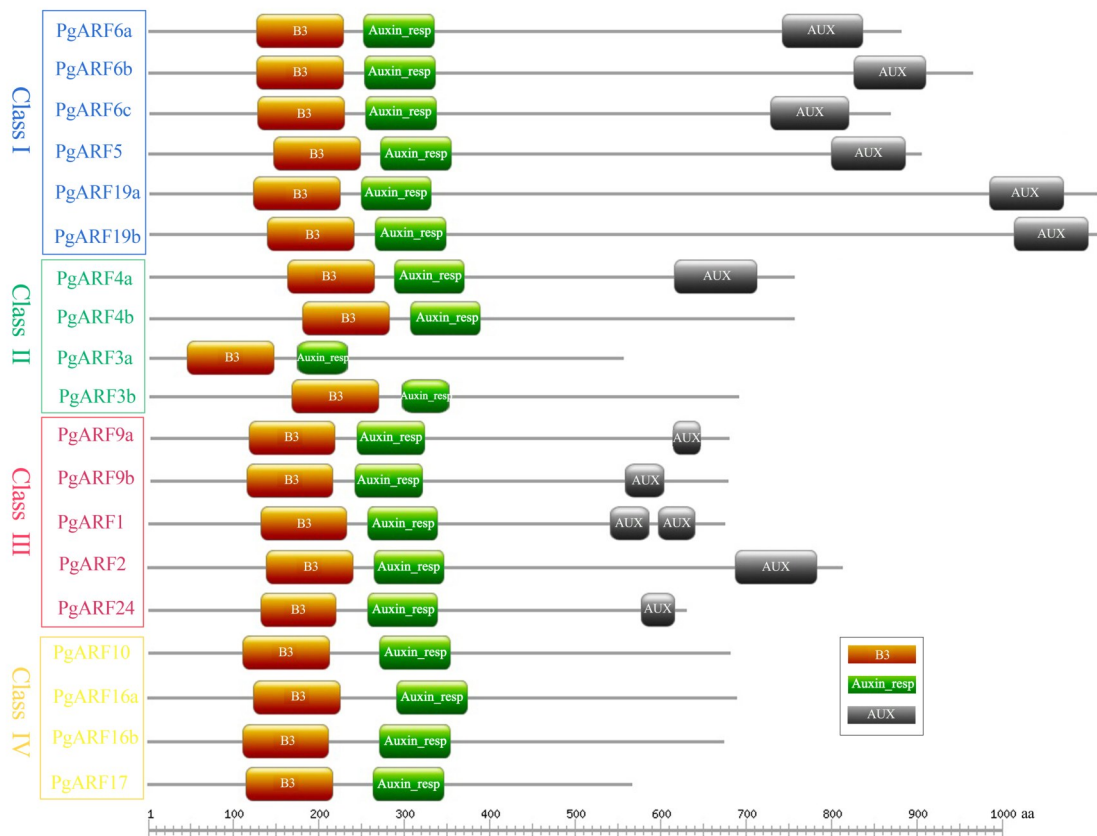


图3 石榴ARF蛋白的保守结构域示意图

Fig. 3 The conserved domains of ARF proteins in pomegranate

情况,利用在线网站MEME,预测了19个可能的PgARF蛋白序列的保守基序(图4-A)。从中可以看出,不同PgARF蛋白序列的基序类型和数量都存在着差异,这也证实了其功能的多样性。结合图3可知,motif 4和motif 5属于B3结构域;motif 7和motif 8属于Auxin\_resp结构域;motif 11和motif 12属于Aux/IAA结构域,这些结构域都是高度保守的。Class I和Class III上的所有PgARF蛋白保守基序都含有12个motif,但*PgARF24*除外(缺少motif 5),这可能是造成进化树上*EgARF24*和*PgARF24*单独分支的原因。Class I、II、III的PgARF成员均含有motif 7和motif 8而Class IV中缺少motif 7,以及

Class IV的PgARF成员缺少motif 11甚至motif 12,可能是Class IV分化的时间早,进化历史长,基因序列发生了较大变化造成的。通过motif Logo再次证实了结构域B3、Auxin\_resp的高度保守,并且结构域中多个氨基酸位点保守不变(图4-B)。

用DNAMAN 8.0对PgARF蛋白进行多重比对得到比对结果(图5-A),发现结构域中多个氨基酸位点是保守不变的,如中心功能区Auxin\_resp结构域中的脯氨酸P、苯丙氨酸F、甘氨酸G、精氨酸R和甲硫氨酸M。甘氨酸与精氨酸之间有1个氨基酸残基,精氨酸与甲硫氨酸间有2个氨基酸残基。这些保守的氨基酸保守区域可能跟转录因子的激活与抑

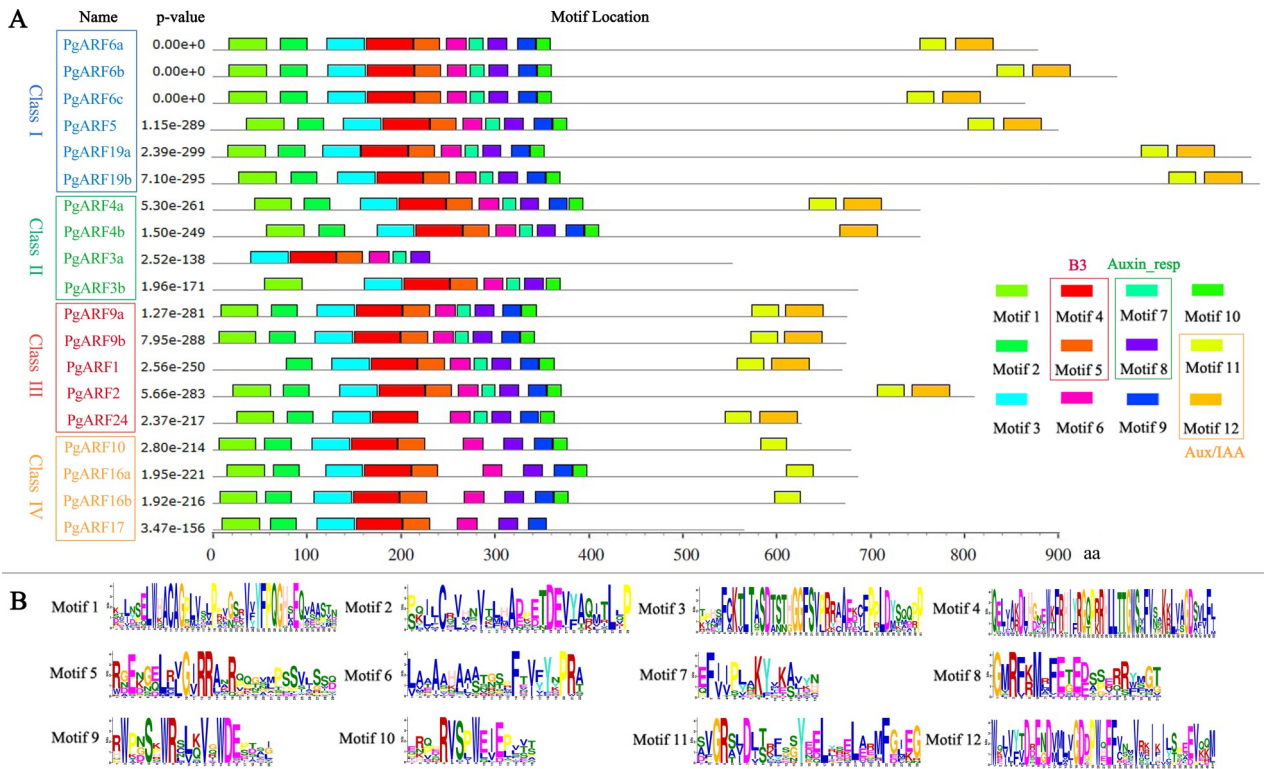


图 4 石榴 ARF 基因家族结构域序列 Logo 及蛋白保守基序  
 Fig. 4 ARF gene family domain sequence Logo and protein conserved motifs

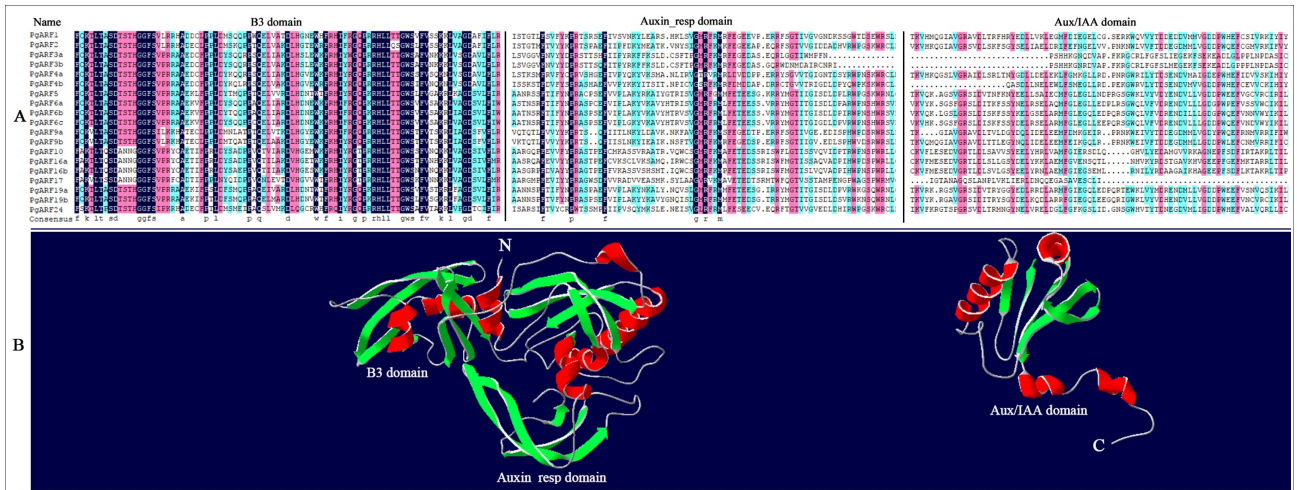


图 5 PgARF 蛋白的结构域序列比对(A)和蛋白三级结构(B)  
 Fig. 5 Sequence alignment analysis (A) and the tertiary structure (B) of PgARF proteins

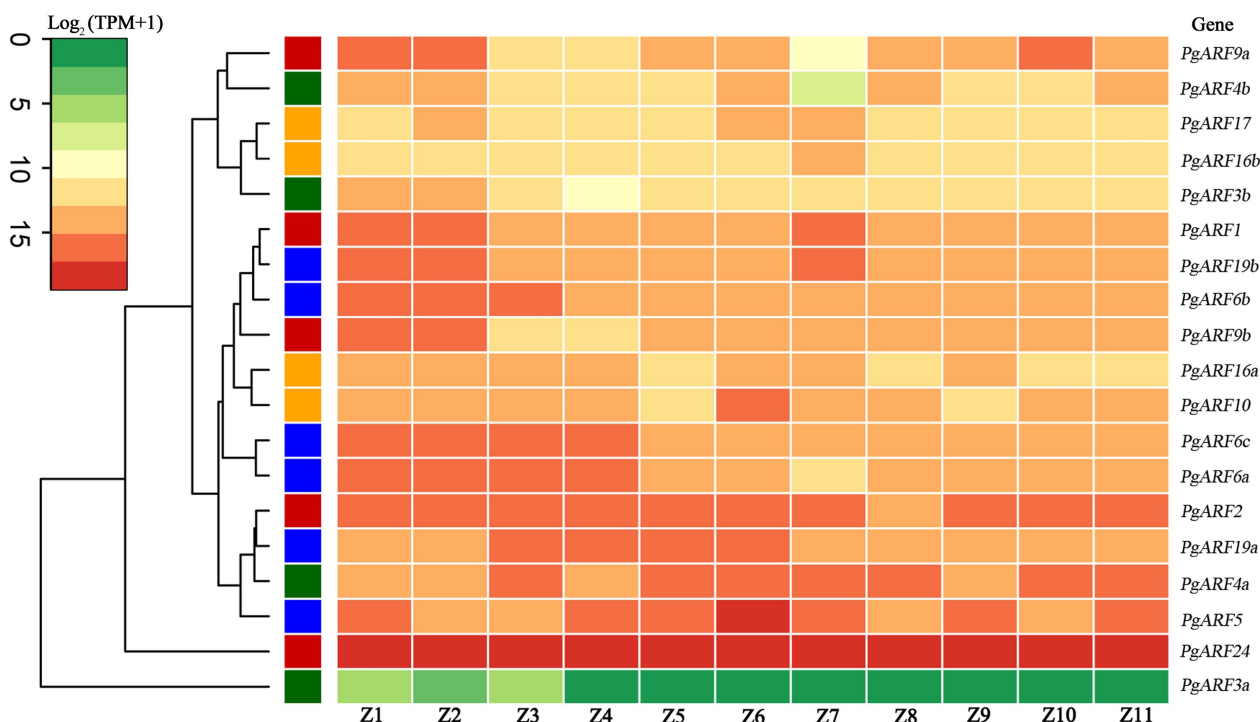
制有关。对 19 个 *PgARF* 蛋白二级结构预测分析后发现,所有的序列都是以无规则卷曲为主要组成结构,α-螺旋、β-折叠和β-转角散布于整个蛋白序列中。最后,对 *PgARF* 蛋白三级结构进行预测(图 5-B),发现石榴 ARF 基因编码蛋白为多链折叠蛋白,以无规则卷曲为主,具有典型的 B3、Auxin\_resp 结构域,多数还具有 Aux/IAA 结构域。

#### 2.4 石榴 ARF 基因家族的表达分析

为进一步分析石榴 ARF 基因的特性和功能,对 ARF 基因组织特异表达情况进行分析,获得了各组织中 *PgARF* 的表达量构建表达热图(图 6)。结果显示,绝大多数的 *PgARF* 基因在不同的组织中均检测到表达,但 *PgARF3a* 在所有组织中表达痕量甚至不表达。*PgARF1*、*PgARF2*、*PgARF4a*、*PgARF6b*、

*PgARF6c*、*PgARF9b*、*PgARF19a*、*PgARF19b* 和 *PgARF24* 在所有的石榴品种和各个组织中表达都相对较高(其中 *PgARF24* 表达量超高),表明这些基因可能在石榴的生长发育中发挥着多方面的功能。在不同的组织部位中,不同 *PgARF* 基因的表达量也存在着差异,如 *PgARF1* 和 *PgARF19b* 在根、叶和内种皮中表达都很高; *PgARF4b* 在内种皮中表达极低; *PgARF5* 在外种皮中表达量最高; *PgARF9a* 在根、叶以及授粉 95 d 后的果皮中集中表达,而随着果

实成熟度的提高,在果皮中表达量呈现先上升再下降的趋势,而在内种皮中则较低表达。而在不同的石榴品种中,不同的 *PgARF* 基因的表达也存在着一定的差异,如 *PgARF19a*、*PgARF10*、*PgARF4b* 等在品种‘突尼斯软籽’和‘大笨子’的成熟果皮中就存在表达差异。而在同一个石榴品种‘大笨子’中,授粉 50 d 后的内种皮和果皮也存在着明显的组织表达差异,如 *PgARF4b* 在内种皮中表达很低,但在果皮中却表现出较高的表达量。



Z1. 根; Z2. 叶; Z3. 成熟花; Z4. 花芽(13.1~25.0 mm); Z5. 成熟果皮; Z6. 授粉 50 d 后的外种皮; Z7. 授粉 50 d 后的内种皮; Z8. 混合; Z9. 授粉 50 d 后果皮; Z10. 授粉 95 d 后果皮; Z11. 授粉 140 d 后果皮。除 Z4、Z5、Z6 和 Z8 对应的品种分别是突尼斯、Wonderful、突尼斯和 Black127 外,其他组织的品种均为大笨子。

Z1. Root; Z2. Flesh leaf; Z3. Mature flower; Z4. Floral bud (13.1-25.0 mm); Z5. Mature pericarp; Z6. Outer seed coat (50 days after pollination); Z7. Inner seed coat (50 days after pollination); Z8. Mixed; Z9. pericarp (50 days after pollination); Z10. Pericarp (95 days after pollination); Z11. Pericarp (140 days after pollination). The cultivars except Tunisia (Z4), Wonderful (Z5), Tunisia (Z6), Black127 (Z8), other tissues are Dabenzi.

图 6 石榴 ARF 基因在不同组织部位的表达热图

Fig. 6 Heatmap of ARF gene expression in different tissues of pomegranate

### 3 讨论

ARF 基因家族作为一个参与生长素信号转导的重要转录调控因子,在调节植物的生长发育中有着重要的作用。随着基因组测序技术的完善以及分子生物学的快速发展,对植物全基因组数据中功能基因的挖掘、定位等已成为研究的热点<sup>[47]</sup>。ARF 基因家族在许多植物中均有发现,如拟南芥(*Arabi-*

*dopsis thaliana*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、巨桉(*Eucalyptus grandis*)、苹果(*Malus domestica*)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、桑树(*Morus alba*)、菠萝(*Ananas comosus*)分别发现了 23、39、25、31、51、19、17、31、35、50、17、20 个 ARF 家族成员<sup>[1, 8, 12, 48-56]</sup>。前人的研究中缺少有关石榴 ARF

基因家族的报道,本研究开展了石榴 ARF 基因的鉴定和表达分析,以期后续石榴 ARF 基因的功能和调控机制研究提供参考。

笔者通过鉴定分析一共筛选出 19 个可能的石榴 ARF 基因家族成员,分析表明石榴 ARF 基因家族存在串联重复现象。通过系统进化分析将石榴 ARF 基因家族分为 4 类,即 Class I、II、III、IV。石榴 ARF 基因结构复杂,外显子数量普遍较多,且随着系统进化树由外到内分支有增多的趋势,可能是因为 ARF 基因 Class IV 位于系统发育树外端,较其他分支分化早,外显子由于内含子的插入不断发生分裂造成的,因此石榴 ARF 基因结构与进化时间长短存在一定的联系。Class III 上存在的由 7 个 *AtARFs* 组成的拟南芥种系特异性亚分支,可能会使拟南芥 ARF 基因产生了一些新的功能。除此拟南芥特异性分支外,3 个物种的 ARF 基因在数量上大致存在着 1:1:1 的关系,可能跟双子叶植物共有的古六倍化事件相关<sup>[29, 57]</sup>。3 个物种在 Class III 上的由 *AtARF9*、*EgARF9A*/*EgARF9B* 和 *PgARF9a*/*PgARF9b* 组成的亚分支,在 Class IV 上的由 *AtARF16*、*EgARF16A*/*EgARF16B* 和 *PgARF16a*/*PgARF16b* 组成的亚分支存在着拟南芥:石榴:巨桉=1:2:2 的关系,这 2 个亚分支的进化可能跟石榴与巨桉共有的古四倍化事件存在联系<sup>[29, 57]</sup>。保守基序分析表明,所有石榴 ARF 蛋白存在保守的 B3、Auxin\_resp 结构域,但 Aux/IAA 结构域在石榴 ARF 蛋白中存在差异。作为最早分化的 Class IV 分支以及 Class II (*PgARF4a* 除外)分支,逐渐在 ARF 基因家族的进化过程中缺失了 motif 12 甚至 motif 11,缺失了 Aux/IAA 结构域,而进化较晚的 Class I 和 Class III 则保留了 Aux/IAA 结构域,继续发挥该功能域的功能。除此之外,其余很多基序的功能还有待进一步研究,但它们在石榴的生长发育过程中一定发挥了重要的作用。

拟南芥作为一种模式植物,根据 *AtARF1*/*AtARF2* 的功能推测其同源基因 *PgARF1*/*PgARF2* 在石榴的叶片和花器官的发育中有重要的调控意义<sup>[13-14]</sup>; *PgARF5* 在石榴的茎中维管组织形成、幼嫩器官的分化以及应对不良外界环境方面应该具有关键作用<sup>[17-18]</sup>;而 *PgARF6a/6b/6c* 的功能可能是调控石榴花器官发育以及果实发育,响应逆境胁迫以维持石榴的正常生长<sup>[21-22]</sup>;推测 *PgARF19a/19b* 可能参与

了石榴中侧根的形成过程<sup>[12, 24-25]</sup>。在对石榴 ARF 基因家族的组织表达分析中,发现绝大多数的 *PgARF* 基因在不同的组织和品种中均有表达,但不同的 *PgARF* 基因在不同的组织品种中表达存在一定的差异,表现出一定组织和品种表达特异性,推测与其基因功能有着密切的联系。如 *PgARF6a/6b/6c* 在花、花芽以及果实各组织中都有较高表达,也在客观上证实了其在维持花器官和果实的发育中具有一定的作用<sup>[21-22]</sup>。基因在不同组织的表达差异和功能有待进一步的研究验证。值得关注的是,在表达图谱中, *PgARF3a* 在几个石榴品种的组织中均表达痕量甚至几乎不表达,并不是因特定的石榴品种而表现出来,而是在几个不同的石榴品种中的组织中均表达痕量,这可能是 *PgARF3a* 在石榴 ARF 基因的扩张进化过程中产生了假基因化,成为无功能的假基因;同样的, *PgARF24* 在所有的石榴品种的对组织均表现出超高表达量,这可能是该基因在基因的扩张进化过程中发生了功能变异,演化出了新的功能,是新功能化作用的结果。为了验证 *PgARF3a* 是否为假基因,利用 PSF<sup>[58-59]</sup> (Pseudogene Finder) <http://molquest.com> 生物信息学工具对该基因和蛋白序列进行预测分析,发现该基因存在移码突变,进一步证实了该基因可能是假基因,而 *PgARF24* 的功能需进一步的验证分析。

ARF 家族基因在植物的生长发育中具有十分重要的地位,笔者选用尽可能多可供获取的与生长发育相关的石榴组织 RNA-seq 数据,验证石榴 ARF 家族基因的组织表达模式。但因 RNA-seq 数据存在部分测序平台不统一,可能会在一定程度上造成组织样本间测序深度不均一,读段长度存在差距,对分析结果造成一定的影响,而石榴品种差异也对表达分析结果产生一定的误差。通过 RNA-seq 数据归一化之后,误差可能会有减小,不同的石榴品种组织间的差异也可以通过表达分析进一步体现。因此,在今后的研究中,在保证尽可能多的 RNA-seq 数据的前提下,应保证样品、测序平台等因素尽量一致,以减小试验等因素造成的误差。

对石榴 ARF 基因的研究分析,为进一步了解石榴 ARF 基因家族成员的结构与功能的关系、揭示 ARF 基因在参与石榴生长发育的调控机制等方面奠定了一定的理论基础。今后研究的重点是石榴 ARF 基因家族成员的功能验证以及 ARF 基因响应

生长素信号的调控机制,有助于了解ARF的基因功能的特异性,推动转录因子的信号传导网络的研究与发展。

## 4 结 论

整合以上基因结构、系统发育与进化、RNA-Seq表达等分析结果,发现石榴ARF蛋白具有典型的B3、Auxin\_resp结构域,多数还具有Aux/IAA结构域。石榴ARF基因家族基因结构和保守基序的进化与进化时间相关,同时其家族成员扩张主要与全基因组复制事件相关。

### 参考文献 References:

- [1] LUO X C, SUN M H, XU R R, SHU H R, WANG J W, ZHANG S Z. Genomewide identification and expression analysis of the *ARF* gene family in apple[J]. *Journal of Genetics*, 2014, 93(3): 785-797.
- [2] ROOSJEN M, PAQUE S, WEIJERS D. Auxin response factors: output control in auxin biology[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 69(2): 179-188.
- [3] GUILFOYLE T J, HAGEN G. Auxin response factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(5): 453-460.
- [4] KUMAR R, TYAGI A K, SHARMA A K. Genome-wide analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2011, 285(3): 245-260.
- [5] YANG J, TIAN L, SUN M X, HUANG X Y, ZHU J, GUAN Y F, JIA Q S, YANG Z N. *ARF17* is essential for pollen wall pattern formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 720-731.
- [6] CHANDLER J W. Auxin response factors[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(5): 1014-1028.
- [7] ABEL S, THEOLOGIS A. Early genes and auxin action[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(1): 9-17.
- [8] WAN S, LI W, ZHU Y, LIU Z, HUANG W, ZHAN J. 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.
- [9] GUILFOYLE T J, ULMASOV T, HAGEN G. The *ARF* family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 1998, 54(7): 619-627.
- [10] TIWARI S B, HAGEN G, GUILFOYLE T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(2): 533-543.
- [11] 赵艳, 瓮巧云, 马海莲, 宋晋辉, 袁进成, 王凌云, 董志平, 刘颖慧. 谷子ARF基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(3): 547-554.
- [12] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE P J, ARIMA K, ALONSO J M, ET A L. Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463.
- [13] ULMASOV T, HAGEN G, GUILFOYLE T J. *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements[J]. *Science*, 1997, 276(5320): 1865-1868.
- [14] ELLIS C M, NAGPAL P, YOUNG J C, HAGEN G, GUILFOYLE T, REED J. *ARF1* and *ARF2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2005, 132(20): 4563-4574.
- [15] SESSIONS A, NEMHAUSER J L, MCCALL A, ROE J L, FELDMANN K A. Ectopic patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs[J]. *Development*, 1997, 124(22): 4481-4491.
- [16] PEKKER I, ALVAREZ J P, ESHED Y. Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 2899-2910.
- [17] HARDTKE C S, BERLETH T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(5): 1405-1411.
- [18] JOHNSON L A, DOUGLAS C J. *Populus trichocarpa* *MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR5 (ARF5)* genes: comparative structure, sub-functionalization, and *Populus-Arabidopsis* microsynteny[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2007, 85(11): 1058-1070.
- [19] MIYASHIMA S, SEBASTIAN J, LEE J Y, HELARIUTTA A. Stem cell function during plant vascular development[J]. *The EMBO Journal*, 2013, 32(2): 178-193.
- [20] TIAN C E, MUTO H, HIGUCHI K, MATAMURA T, TATEMATSU K, KOSHIBA T, YAMAMOTO K T. Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition [J]. *The Plant Journal*, 2004, 40(3): 333-343.
- [21] NAGPAL P, ELLIS C M, WEBER H, PLOENSE S E, BARKAW L S. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation[J]. *Development*, 2005, 132(18): 4107-4118.
- [22] 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.
- [23] FUKAKI H, NAKAO Y, OKUSHIMA Y, THEOLOGIS A, TASHAKA M. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(3): 382-395.
- [24] LI J, DAI X, ZHAO Y. A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(3): 899-908.

- [25] OKUSHIMA Y, FUKAKI H, ONODA M, THEOLOGIS A, TASHAKA M. *ARF7* and *ARF19* regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(1): 118-130.
- [26] FENG Z, ZHU J, DU X, CUI X. Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2012, 236(4): 1227-1237.
- [27] 曹尚银, 侯乐峰. 中国果树志: 石榴卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 2013.  
CAO Shangyin, HOU Lefeng. Chinese fruit tree: pomegranate volume[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2013.
- [28] XUE H, CAO S, LI H, ZHANG J, NIU J, CHEN L, ZHANG F, ZHAO D. *De novo* transcriptome assembly and quantification reveal differentially expressed genes between soft-seed and hard-seed pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178809.
- [29] YUAN Z, FANG Y, ZHANG T, FEI Z, HAN F, LIU C, ET AL. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 1-12.
- [30] QIN G, XU C Y, MING R, TANG H B, GUYOT R, ET AL. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome and the genomics of punicalagin biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 2017, 91(6): 1108-1128.
- [31] 张太奎, 起国海, 叶红莲, 张孟伟, 肖巍, 苑兆和. 石榴转录组密码子使用偏向性[J]. *园艺学报*, 2017, 44(4): 675-690.  
ZHANG Taikui, QI Guohai, YE Honglian, ZHANG Mengwei, XIAO Wei, YUAN Zhaohe. Codon usage bias in pomegranate transcriptome[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(4): 675-690.
- [32] ONO N N, BRITTON M T, FASS J N, NICOLET C M, LIN D, TIAN L. Exploring the transcriptome landscape of pomegranate fruit peel for natural product biosynthetic gene and SSR marker discovery[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(10): 800-813.
- [33] OPHIR R, SHERMAN A, RUBINSTEIN M, ESHED R, SCHWAGER M S, HAREL-BEJA R, BAR-YA'AKOV I, HOLLAND D. Single-nucleotide polymorphism markers from de-novo assembly of the pomegranate transcriptome reveal germplasm genetic diversity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88998.
- [34] ZHANG T, LIU C, ZHANG H, YUAN Z. An integrated approach to identify cytochrome P450 superfamilies in plant species within the malvids[C]//International Conference on Bioinformatics and Computational Biology. ACM, 2017: 11-16.
- [35] JIN J, TIAN F, YANG D C, MENG Y Q, KONG L, ET AL. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(Database issue): 1040-1045.
- [36] MARCO P, COGGILL P C, EBERHARDT R Y, JAINA M, JOHN T, ET AL. The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: 290-301.
- [37] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): 29-37.
- [38] SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, CHRIS P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(11): 5857-5864.
- [39] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, CHITSAZ F, DERBYSHIRE M K, ET AL. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): 225-229.
- [40] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, BARATIN D, CSARDI G, ET AL. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Web Server issue): 597-603.
- [41] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [42] HU B, JIN J, GUO A Y, ZHANG H, LUO J, ET AL. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [43] SIGRIST C J A, CERUTTI L, DE CASTRO E, LANGENDIJK-GENEVAUX P S, BULLIARD V, BAIROCH A, HULO N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(1): 161-166.
- [44] BAILEY T L, MIKAEL B, BUSKE F A, FRITH M, GRANT C E, ET AL. MEME Suite: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(2): 202-208.
- [45] BRAY N L, PIMENTEL H, MELSTED P, PACHTER L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 525-527.
- [46] CHEN L, ZHANG J, LI H, NIU J, XUE H, CAO S, ET AL. Transcriptomic analysis reveals candidate genes for female sterility in pomegranate flowers[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1430.
- [47] 邓浪, 沈兵琪, 王连春, 周军, 刘惠民, 周凡, 李德龙. ‘红阳’猕猴桃全基因组 AP2/EREBP 转录因子生物信息学分析[J]. *果树学报*, 2017, 34(7): 790-805.  
DENG Lang, SHEN Bingqi, WANG Lianchun, ZHOU Jun, LIU Huiming, ZHOU Fan, LI Delong. Genome-wide bioinformatics analysis of AP2/EREBP transcription factor in ‘Hongyang’ kiwifruit[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(7): 790-805.
- [48] KALLURI U C, DIFAZIO S P, BRUNNER A M, TUSKAN G A. Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*[J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1): 59.
- [49] WANG D, PEI K Y, SUN Z, LI S, LIU H, TANG K, HAN B, TAO Y. Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Gene*, 2007, 394(1): 13-24.
- [50] XING H, PUDAKE R N, GUO G, XING G, HU Z, ZHANG Y, SUN Q, NI Z. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (*ARF*) gene family in maize[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 178.
- [51] VAN HA C, LE D T, NISHIYAMA R, WATANABE Y, SULLIEMAN S, TRAN U T, MOCHIDA K, DONG N V, ET AL. The auxin response factor transcription factor family in soy-

- bean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress[J]. DNA Research, 2013, 20(5): 511-524.
- [52] YU H, SOLER M, MILA I, ET A L. Genome-wide characterization and expression profiling of the AUXIN RESPONSE FACTOR (*ARF*) gene family in *Eucalyptus grandis*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108906.
- [53] SUN R, WANG K, GUO T, CLEMENTE H S, SAVELLI B, ET A L. Genome-wide identification of auxin response factor (*ARF*) genes and its tissue-specific prominent expression in *Gossypium raimondii*[J]. Functional & Integrative Genomics, 2015, 15(4): 481-493.
- [54] 孙亭亭,张磊,陈乐,龚达平,王大伟,陈雅琼,陈蕾,孙玉合. 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.
- SUN Tingting, ZHANG Lei, CHEN Le, GONG Daping, WANG Dawei, CHEN Yaqiong, CHEN Lei, SUN Yuhe. Identification and expression analysis of the *ARF* gene family in *Nicotiana tabacum*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 162-168.
- [55] BARANWAL V K, NEGI N, KHURANA P. Auxin response factor genes repertoire in mulberry: identification, and structural, functional and evolutionary analyses[J]. Genes, 2017, 8(9): 202.
- [56] SU Z, WANG L, LI W, ZHAO L, HUANG X, AZEM S M, QIN Y. Genome-wide identification of auxin response factor (*ARF*) genes family and its tissue-specific prominent expression in pineapple (*Ananas comosus*) [J]. Tropical Plant Biology, 2017, 10: 86-96.
- [57] 张太奎,苑兆和. 植物古基因组学研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(1): 44-56.
- ZHANG Taikui, YUAN Zhaohe. Progress in plant paleogenomics[J]. Hereditas, 2018, 40(1): 44-56.
- [58] SOLOVYEV V, KOSAREV P, SELEDSOV I, DENIS V. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters[J]. Genome Biology, 2006, 7(S10): 1-12.
- [59] XIAO J, SEKHVAL M, LI P, RAGUPATHY R, CLOUTIER S, ET A L. Pseudogenes and their genome-wide prediction in plants:[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(12): 1991.

## 第17届中国(建德)草莓文化旅游节暨第11届建德新安江草莓节在浙江省建德市隆重召开

2019年1月4—6日,由中国园艺学会、浙江省农业厅、杭州市人民政府主办,中国园艺学会草莓分会、杭州市农业局、建德市人民政府承办,浙江省农科院、杭州市农科院、建德市草莓产业协会协办的第17届中国(建德)草莓文化旅游节暨第11届建德新安江草莓节在浙江省建德市隆重召开。

中国工程院副院长邓秀新院士、中国工程院丁一汇院士,中国园艺学会理事长杜永臣,科技部农村司、浙江省、杭州市及建德市有关领导,国内外草莓业界专家学者、企业精英和社会各界人士齐聚建德市,共同参加一年一度的全国草莓交流盛会。今年参会人员达1100余人,为历届最多。

本次全国精品草莓评比活动中,收到来自21个省市自治区788份草莓样品,共计65个品种,其中中国产品种37个219份样品。经过30位专家评选,建德市红姬草莓专业合作社选送的浙江省农科院培育的‘越心’摘得最高荣誉奖“长城杯”。北京市农林科学院培育的品种(系)‘白雪公主’、‘通州公主’、‘京桃香’,沈阳农业大学培育的品种‘艳丽’,江苏省农科院培育的品种‘守玉’,杭州市农科院培育的品种(系)‘红玉’、‘粉玉’等荣获国产组金奖。

本次会议邀请了中国工程院邓秀新院士(问题驱动的柑橘研究——从基础到产业),江苏丘陵地区镇江农科所、时代楷模赵亚夫教授(草莓产业发展之路),日本山形大学西洋隆教授(日本草莓栽培历史、现状与未来),美国康涅狄格大学李义教授(机遇和挑战:基因编辑技术在草莓等无性繁殖作物遗传改良上的应用),智利天主教大学 Marina Gambardella教授(智利草莓产业与智利草莓种质资源)就相关专题做了主旨报告。同时,浙江省农科院蒋桂华研究员(草莓

育苗存在的主要问题与繁育技术),吉林省草莓协会李怀宝会长(“一带一路”助力草莓出口),安徽省农科院宁志怨博士(甜查理草莓红叶病病原菌的鉴定及防治),江苏镇江市农科院吉沐祥研究员(以功能微生物菌为核心的草莓促生防病新技术),四川省农科院李洪雯研究员(高原藏区彝区夏秋草莓持续优质稳产栽培技术)就相关问题进行了学术报告。建德市草莓种植户民间高手吴东良、李建伟、赵建明及“农家政”智慧草莓园张荣俊分享了草莓生产中的体会与经验。

建美丽乡村,德美味草莓!本次大会还举办了首届中国草莓展,搭建了中国草莓产业商务对接第一平台。这一新平台将更好地帮助对接全国草莓产业上下游资源,为莓农带来新技术、新观念、新思路,满足莓农的信息需求。众多嘉宾还从各自擅长的领域讲述草莓种植、销售方面的经验。本次会议还观摩了建德草莓小镇、建伟草莓家庭农场。会上发放了《全方位看草莓》、《草莓的生理生态及栽培技术》、《草莓的障碍与对策及主要品种特性》等书籍。

会议最后,山东省济南市人民政府、江苏省南京市溧水区人民政府、江苏省句容市人民政府为了竞选“第18届中国草莓文化节”进行了全面陈述。

建德是“中国草莓之乡”,总面积8.12万亩,其中建德市1.62万亩、异地种植6.50万亩,产量14.78万吨,建德草莓种植和育苗产值39.6亿。有17000建德人分布在全国27个省市从事草莓生产,他们为中国草莓产业的发展做出了巨大贡献。

(常琳琳 北京市林业果树科学研究院·北京市草莓工程技术研究中心·中国园艺学会草莓分会 100097)