

# 基于转录组的番荔枝 ARF 基因家族鉴定及其在花发育中的表达分析

周 艳, 莫雨杏, 刘淑艺, 李卫锦, 黎海利, 刘锴栋\*

岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江 524048

**摘要:** 鉴定番荔枝 ARF 家族基因, 并分析其在花发育中的表达谱, 为深入探索 ARF 家族基因调控花发育的机制奠定基础, 为解决番荔枝产业上出现的“花而不实”、结果率低等问题提供理论依据。以番荔枝为研究对象, 基于转录组测序, 筛选鉴定出 11 个番荔枝 *AsARF* 基因。通过同源进化分析、蛋白结构域分析、亚细胞定位、qRT-PCR 等技术, 初步分析了 *AsARF* 家族基因的生物学功能。进化树分析结果显示, *AsARF* 蛋白可以被分为 5 组。*AsARF* 的预测蛋白分子量在 73.85~112.51 kDa 之间, 等电点分布于 5.42~7.63 之间。所有 *AsARF* 蛋白均含有 1 个 DNA 结合结构域和 1 个中间区域结构域, 除 *AsARF3a*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 外, 其他蛋白还存在 1 个 C-末端二聚化结构域。基于蛋白中间区域的氨基酸富集情况, 推测 *AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6c*、*AsARF6d*、*AsARF7* 和 *AsARF16* 这 6 个蛋白可能为转录激活子, 而 *AsARF2*、*AsARF3a*、*AsARF3b*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 这 5 个蛋白推测为转录抑制子。鉴定得到 3 个 CTD 结构域缺失的 ARF 基因: *AsARF3a*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b*, 它们可能有着独特的生物学功能。亚细胞定位预测结果显示, *AsARF* 蛋白主要定位在细胞核中。亚细胞定位实验结果显示, *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 蛋白定位于细胞核, 表明 *AsARF* 蛋白具有转录因子的核定位特征。qRT-PCR 结果显示, *AsARF3a*、*AsARF3b*、*AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6a* 和 *AsARF7* 在花芽期表达量最高, *AsARF2* 和 *AsARF6b* 的表达量在花蕾期最高。*AsARF2*、*AsARF3a*、*AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6b*、*AsARF6c* 和 *AsARF16* 基因在正常花中的呈现高表达, 而 *AsARF3b*、*AsARF6a*、*AsARF6d* 和 *AsARF7* 则在畸形花中表达量更高。*AsARF6b*、*AsARF6c* 在正常花中表达量高, 而 *AsARF6a*、*AsARF6d* 在畸形花中表达量更高, 说明它们在花的正常发育中起到了重要作用。

**关键词:** 番荔枝; 生长素响应因子; 生物信息学分析; 花发育; 表达分析

中图分类号: S667.9 文献标识码: A

## Transcriptome-wide Identification of the ARF Gene Family in Sugar Apple (*Annona squamosa* L.) and Expression Analysis During Flower Development

ZHOU Yan, MO Yuxing, LIU Shuyi, LI Weijin, LI Haili, LIU Kaidong\*

Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China

**Abstract:** In order to reveal the mechanism of flower development and provide a theoretical basis for solving the problems of flowering in the sugar apple industry, the Auxin Response Factor (ARF) family genes were identified and the expression patterns were analyzed. Based on transcriptome sequencing, 11 *AsARF* genes were selected and identified. The biological functions of *AsARF* family genes were preliminarily analyzed by homologous evolution analysis, protein domain analysis, subcellular localization, qRT-PCR, and other techniques. The *AsARFs* were divided into five classes based on phylogenetic analysis. The proteins had molecular weight varying from 73.85 to 112.51 kDa and isoelectric

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-07-15

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31201586); 岭南师范学院雷阳学者岗位计划资助项目 (2022)。

作者简介 周 艳 (1991—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 园艺植物生理生化及分子生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 刘锴栋 (LIU Kaidong), E-mail: liukaidong2001@126.com。

point from 5.42 to 7.63. All the AsARFs contained two domains of DBD and MR, and, except for AsARF3a, 6a and 6b, they also all contained a CTD domain. Subcellular location prediction results showed that the AsARF members were mainly located in the nucleus. Based on amino acid enrichment in the intermediate region of the protein, AsARF5a, AsARF5b, AsARF6c, AsARF6d, AsARF7 and AsARF16 were speculated to be transcriptional activators, while AsARF2, AsARF3a, AsARF3b, AsARF6a and AsARF6b were presumed to be transcriptional repressors. Three CTD domain-deleted ARF genes were identified and they may have unique biological functions. The results of subcellular location experiments showed that AsARF2, AsARF3a and AsARF6a were localized in the cell nucleus. Real-time quantitative PCR results showed that *AsARF3a*, *AsARF3b*, *AsARF5a*, *AsARF5b*, *AsARF6a* and *AsARF7* genes were expressed more in the inflorescent meristem. *AsARF2* and *AsARF6b* genes were highly expressed in flower buds. *AsARF2*, *AsARF3a*, *AsARF5a*, *AsARF5b*, *AsARF6b*, *AsARF6c* and *AsARF16* genes were predominantly expressed in normal flowers, while the expression of *AsARF3b*, *AsARF6a*, *AsARF6d* and *AsARF7* genes in malformed flowers was greater than that in normal flowers. These results suggest that AsARF may play key roles in regulating the flower development in sugar apple. The high expression of *AsARF6b* and *AsARF6c* in normal flowers and *AsARF6a* and *AsARF6d* in abnormal flowers indicate that they play important roles in the normal development of flowers.

**Keywords:** *Annona squamosa* L.; ARF; bioinformatics analysis; flower development; expression analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.04.001

番荔枝 (*Annona squamosa* L.), 也称为释迦果, 属番荔枝科植物, 是热带、亚热带地区的著名水果, 分布于福建、广西、广东、海南、云南等地<sup>[1]</sup>。由于番荔枝的叶柄抱嵌着叶芽, 所以叶片不脱落, 叶芽则无法萌发<sup>[2-3]</sup>。番荔枝的花具有雌雄异熟且雌蕊先熟的特点, 常常出现花发育异常和畸形花现象, 导致“花而不实”、结果率低等问题, 从而限制了番荔枝产业的发展<sup>[4-6]</sup>。

生长素响应因子 (auxin response factor, ARF) 位于生长素信号传递途径中的核心位置, 能够通过调控生长素信号, 以调控生长素相应基因的表达, 从而影响植物的生长发育<sup>[7-8]</sup>。ARF 基因一般以基因家族的形式存在, 通常有 3 个经典的蛋白保守结构域: DNA 结合结构域 (DBD), 中间结构域 (MR) 和 C 末端二聚化结构 (CTD)<sup>[8]</sup>。ARF 通过识别并且结合位于生长素响应基因启动子中的生长素响应元件 AuxREs (TGTCTC), 抑制或激活下游响应基因的表达<sup>[9]</sup>, 并且 ARF 能够通过 AOX/IAA 形成二聚体, 影响 ARF 蛋白质间的相互作用<sup>[8]</sup>。近年来, 越来越多的 ARF 被报道可能参与了植物花的发育。番茄 *SIARF1*、*SIARF9*、*SIARF11*、*SIARF15* 和 *SIARF16* 参与调控花的发育, 均在花发育过程中表达, 且 *SIARF16* 在花芽中表达量最高<sup>[10]</sup>。番茄 *SIARF2* 在花蕾中具有最高的表达量, 但是不影响花的形成<sup>[11]</sup>。果梅中 *PmARF11* 基因在转基因烟草的花瓣中具有高表达水平, 且显著影响花瓣颜色、边缘深裂和萼片变化, 由此可以预测 *PmARF11* 基因在花瓣发

育过程发挥重要作用<sup>[12]</sup>。黄瓜 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 在雌花中不显著表达, 在雄花中表达水平较高, 预测 *CsARF10b* 和 *CsARF10c* 基因能够调控雄花发育<sup>[13]</sup>。在番木瓜中, *CpARF1*、*CpARF2*、*CpARF4*、*CpARF5* 和 *CpARF10* 基因在花发育的早期高表达, 随后则呈现下降趋势, 而 *CpARF6* 的表达则随着花发育的进程不断上升<sup>[8]</sup>。虽然番荔枝的全基因组测序尚无报道, 但是由于转录组测序技术的快速发展为研究番荔枝 ARF 基因家族提供了良好的平台。

本课题组前期对番荔枝花发育 4 个时期进行了转录组测序, 获得 71 948 条 unigenes 序列信息, 平均长度为 825.4 bp, 将获得的 unigenes 序列与已知数据库进行比对, 共有 24 911 条 unigenes 被注释到<sup>[14]</sup>。本研究基于此数据库, 在转录组层面利用生物信息学方法对番荔枝 ARF 家族基因成员进行鉴定, 分析番荔枝 ARF 家族蛋白的系统进化、理化性质、亚细胞定位、二级三级结构等, 并通过 qRT-PCR 分析番荔枝 ARF 家族基因在花发育不同阶段和畸形花中的表达, 为今后番荔枝 ARF 家族基因的克隆和功能研究, 深入探索番荔枝 ARF 家族基因调控花发育的机制奠定基础, 有助于解决番荔枝产业上出现的“花而不实”、结果率低等问题。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

番荔枝 (*Annona squamosa* L.) 种植于岭南师

范学院热带果树试验地, 常规栽培管理。于 2018 年 7—8 月分别采摘花芽期 (I, 1 mm < 花芽 < 2 mm)、花蕾期 (II, 5 mm < 花蕾 < 6 mm)、开花前期 (III, 花瓣轻微张开)、开花期 (IV, 花瓣张开) 4 个阶段的花。于 2019 年 7—8 月分别采摘正常的花蕾 (NF) 和畸形的花蕾 (MF)。不同花的材料重复 3 次, 取样后立即用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱储存备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取与转录组测序** 把 1.5 mL 离心管放置冰上预冷, 分别加入 1 mL TRNzol 液, 摇匀后加入氯仿/异戊醇混合液 200  $\mu$ L、巯基乙醇 8  $\mu$ L, 将研磨得到的 (花芽期、花蕾期、开花前期、开花期) 花样品各 100 mg 加入上述离心管中。将样品震荡混合, 在 4 °C 下, 12 000 $\times$ g 离心 10 min。取上清液 750  $\mu$ L, 加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇, 震荡混匀, 在 4 °C 下, 12 000 $\times$ g 离心 10 min。重复上述步骤 2 遍。取上清液 650  $\mu$ L, 加入等体积异丙醇, 65  $\mu$ L 醋酸钠溶液, 置于 -20 °C, 沉淀 30 min。冰浴后的样本, 在 4 °C 下, 12 000 $\times$ g 离心 20 min, 弃上清液, 加入 500  $\mu$ L 75%乙醇, 洗涤沉淀, 离心 10 min, 并重复 2 遍。洗涤后的样本, 吸干乙醇, 自然晾干后备用。

建库用的 RNA 需除去污染 DNA。方法如下: 加入 42  $\mu$ L RNA-free 的 DNA 酶, 直至全部溶解。在 37 °C 水浴消化 30 min 后, 再加入 550  $\mu$ L 的 RNA-free 水至 600  $\mu$ L, 在加入水饱和酚/氯仿/异戊醇沉淀, 离心弃上清液。重复上述洗涤步骤。RNA 充分溶解后, 稀释 10 倍, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 质量。

番荔枝花发育不同阶段 (花芽、花蕾、开花前期、开花期) 转录组数据由基迪奥生物公司进行测序获得, 后续分析基于此测序结果数据。

**1.2.2 番荔枝 ARF 的系统进化分析** 利用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.Php>) 在线软件对基因结构进行分析。拟南芥 ARF 基因序列从生物信息资源网站 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 直接下载。使用 MEGA7.0 (<https://www.megasoftware.net/mega5/>)、TreeView1.6 (<http://www.brc.dcs.gla.ac.uk/ser-vices/>) 在线软件预测蛋白结构域, 并通过邻接法, 校验参数 (bootstrap) 设置为 1000, 构建系统进化树。使用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对 ARF 蛋白氨基酸进行多重序列比对。

**1.2.3 番荔枝 ARF 基因家族理化性质及蛋白结构分析** 利用在线软件 Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析预测番荔枝 ARF 蛋白序列的分子量、等电点、不稳定系数、脂肪指数和疏水性等基本的理化性质。利用在线软件 Prabi (NPS@:SOPMA secondary structure prediction, [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 对 ARF 蛋白质序列进行二级结构  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角、无规则卷曲进行预测。利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对 ARF 蛋白质序列进行三级结构分析。利用在线软件 NCBI 的 CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析番荔枝 ARF 家族蛋白的保守结构域。利用 MEGA 7.0 软件分析 ARF 中间结构域 (MR) 的氨基酸组成。

**1.2.4 番荔枝 ARF 蛋白的亚细胞定位分析** 利用在线软件 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=prgrams&subgroup=proloc>) 对 ARF 蛋白进行亚细胞定位分析。同时将得到的 *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 全长序列编码区 CDS 序列克隆到 pCAMBIA1302-35S-GFP 载体中。使用 pCAMBIA1302-35S-GFP 空载体为阴性对照。将构建完毕的载体和 GFP 空载体转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 挑取单克隆菌落, 进行 PCR 验证, 并通过摇床大量培养。以阳性克隆扩增后的菌液注射本氏烟草叶片。以培养 48 h 后的烟草叶片制作临时装片, 在激发光波长为 488 nm 和发射光波长为 625~725 nm 的条件下用激光共聚焦显微镜下进行荧光信号检测。观察产生的绿色荧光在烟草表皮细胞内的分布情况。

**1.2.5 番荔枝 ARF 家族基因在花发育中的表达分析** 分别提取番荔枝花发育 4 个阶段花器官、正常花以及畸形花的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以实时荧光定量 PCR 技术检测 *AsARF* 家族基因的表达。按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 操作, 以 *AsActin* 为内参基因, 在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 检测基因的表达量。反应条件: 96 °C 1 min, 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 40 次循环。每个样品重复 3 次。反应结束后分析荧光值变化曲线和溶解曲线。相对定量分析采用比较 Ct 法, 目的基因的相对表达水平为  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。具体引物信息见表 1。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
AsARF2	ATGGTGAGCTCCGTGTGG	AACTCAGATGGGCTCGTCC
AsARF3a	GTTGCTAGGGACTTGCATGG	TATGAAGCCGCACTTTTAAGC
AsARF3b	ACTACAACCCAAGGGCGAGTC	TCTCCACTTTGAACCAGGCCA
AsARF5a	GGCCACATTCAAAGTGGAGGA	TTCGGCATGTTTTCCCGTC
AsARF5b	GGCCACATTCAAAGTGGAGGA	TTCGGCATGTTTTCCCGTC
AsARF6a	GTTTCTGTTGGCATGCGTT	AATGTTGCGAGTGGCTCGA
AsARF6b	TACAACCCACGGGCTAGTC	CAACCTTGACAGAACGCCA
AsARF6c	GCTTATAGCGAGGGACTTGC	GGCATCACAGTTTGTGGTCGA
AsARF6d	TCTAGATCCTGTTTCGCTGG	GGAAACATGGCACCTCAGG
AsARF7	CATGCAGCAGAAACCTCAG	CACGTAGGAAGCGATTGTG
AsARF16	GTCTTTTCGCCAAGACGCTG	TCTGATTCACGAAGGTGCTCC
AsActin	GACACCATCCCCAGAATCC	CCCCAGAAGAACACCCTGT

### 1.3 数据处理

使用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA) 和差异显著性检验 (Duncan's 法)。

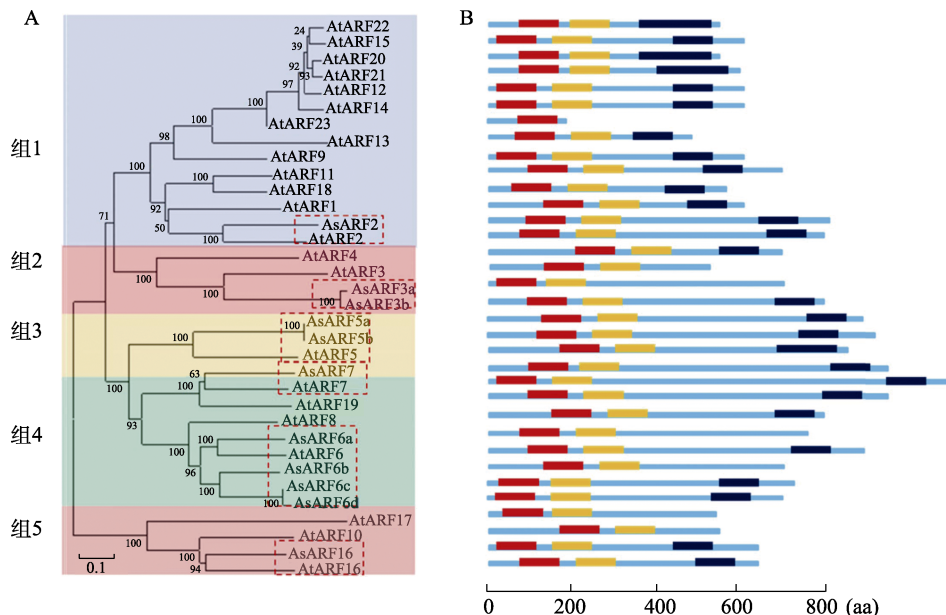
## 2 结果与分析

### 2.1 番荔枝 ARF 家族基因的鉴定及系统进化分析

基于番荔枝花发育不同阶段转录组测序数据, 在 NR、NT、Swiss-Prot 和 PFAM 4 个数据库进行注释, 初步注释到 18 个 ARF 转录因子相关

基因, 通过 NCBI Blast 和 SMART 软件预测, 去除重复序列及冗余转录本后, 最终得到 11 个 ARF 转录因子。

为了研究番荔枝 11 个 ARF 蛋白家族的进化关系与功能, 利用 MEGA7.0 软件构建番荔枝和拟南芥 ARF 蛋白家族的系统进化树, 根据进化树将 2 个物种的 ARF 家族蛋白进行聚类分析, 共分为 5 组 (图 1A)。对于番荔枝来说, 第 1 组包括 1 个 AsARF 基因家族成员 (*AsARF2*), 占基因家族成员总数的 9.09%; 第 2 组包括 2 个 AsARF 基



红色: DNA 结合结构域; 黄色: 中间区域结构域; 蓝色: C-末端二聚化结构域。

Red: DNA-binding domain (DBD); Yellow: Middle region domain (MR); Blue: C-terminal dimerization domain (CTD).

图 1 番荔枝 ARF 系统进化 (A) 和蛋白结构域 (B) 分析

Fig. 1 Analysis of phylogenesis (A) and protein domains (B) of ARF in sugar apple

因家族成员 (*AsARF3a*、*AsARF3b*)，占基因家族成员总数的 18.18%；第 3 组包括 3 个 *AsARF* 基因家族成员 (*AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF7*)，占基因家族成员总数的 27.27%；第 4 组包括 4 个 *AsARF* 基因家族成员 (*AsARF6a*、*AsARF6b*、*AsARF6c*、*AsARF6d*)，占基因家族成员总数的 36.36%；第 5 组包括 1 个 *AsARF* 基因家族成员 (*AsARF7*)，占基因家族成员总数的 9.09%。

进一步分析表明，大部分 *AsARF* 包含 3 个经典的结构域，分别是 DNA 结合结构域 (DBD)、

中间区域结构域 (MR) 和 C-末端二聚化结构域 (CTD)。 *AsARF3a*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 只含有 DNA 结合结构域和中间区域结构域，不含有 C-末端二聚化结构域，其他 *AsARF* 均含有 3 个完整的结构域 (图 1B)。

通过 ClustalW 软件进行比对，如图 2 所示，可以得出大部分 ARF 蛋白家族包含 3 个特有的保守结构域，即 DNA 结合结构域 (DBD)、中间区域结构域 (MR)、C-末端二聚化结构域 (CTD)，证实上述蛋白序列具有极高的序列相似性。

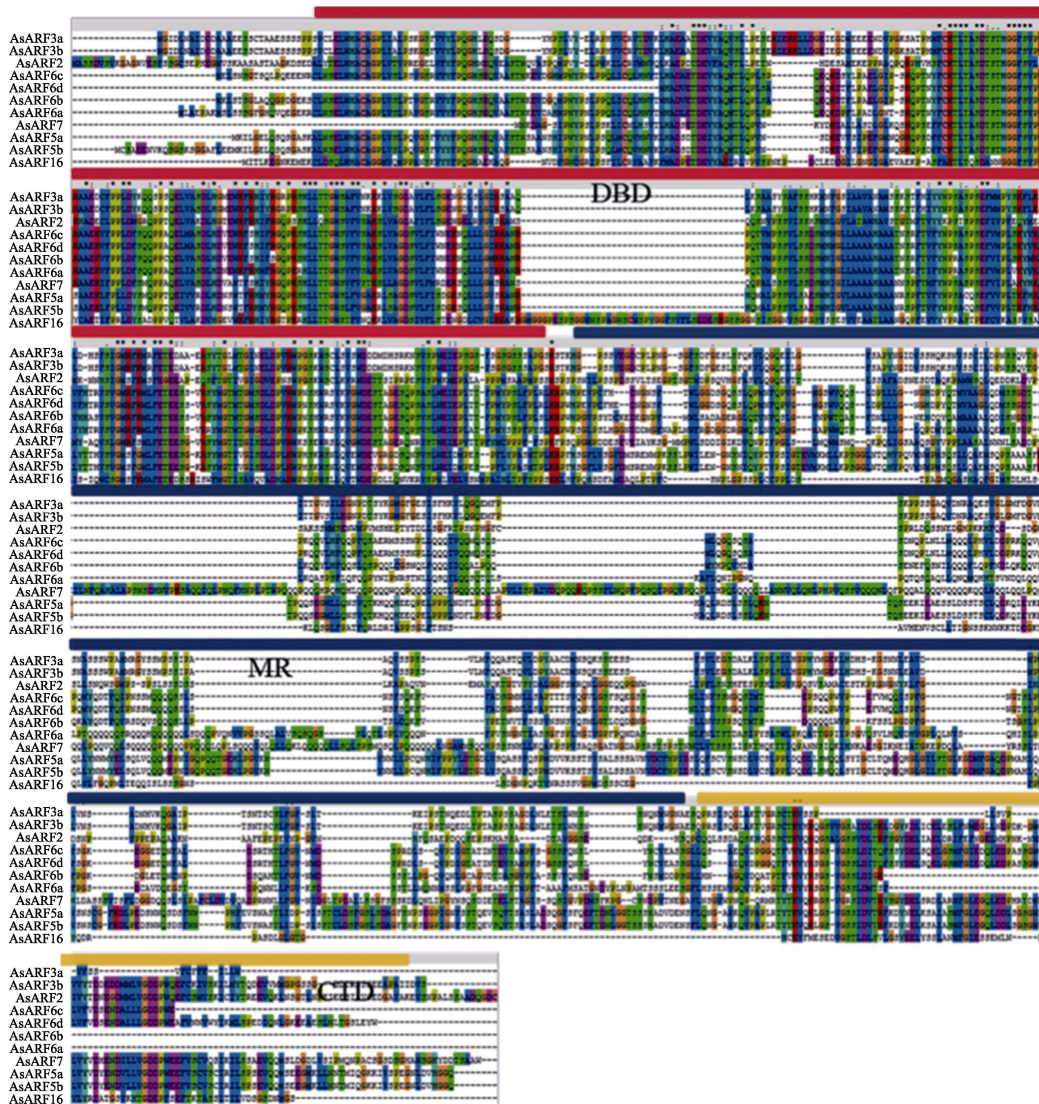


图 2 番荔枝 ARF 蛋白家族的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of ARF protein family in sugar apple

## 2.2 番荔枝 ARF 基因家族理化性质分析

如表 2 所示，番荔枝 ARF 家族成员理论分子量在 73.85~112.51 kDa 之间，氨基酸数量在 677~1007 aa 之间，等电点分布在 5.42~7.63 之间，

11 个 ARF 蛋白的平均等电点为 6.28。有 8 个番荔枝 ARF 蛋白呈酸性，3 个番荔枝 ARF 蛋白呈碱性，预测在酸性亚细胞环境中，大部分番荔枝 ARF 蛋白才会发挥作用。11 个番荔枝 ARF 蛋白的脂

脂系数大小在 62.66~77.1 之间;番荔枝 ARF 蛋白亲水系数大小在-0.648~0.351 之间,属于亲水性蛋白;所有 ARF 的不稳定系数均大于 40,预测番荔枝 ARF 蛋白为不稳定蛋白。

番荔枝 ARF 家族蛋白二级结构中,α-螺旋和

无规则卷曲所占比例比较大,所占比例从大到小排序:无规则卷曲>α-螺旋>延伸链>β-转角。采用 SWISS-MODEL 对番荔枝 ARF 蛋白三级结构进行分析,结果表明番荔枝 ARF 蛋白主要由无规则卷曲、α-螺旋、β-转角等构成三级结构(图 3)。

表 2 番荔枝 ARF 基因家族信息  
Tab. 2 The information of ARF genes family in sugar apple

基因 Gene	基因 ID Gene ID	Auxin-resp 结构域 Auxin-resp domain	B3 结构域 B3 domain	AUX-IAA 结构域 AUX-IAA domain	氨基酸 数量 Number of amino acids	分子量 Molecular weight/Da	等 电 点 pI	不 稳 定 系 数 Instabil- ity index	脂 肪 系 数 Aliphatic index	亲 水 系 数 GRAVY	二级结构 Secondary structure			
											α-螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β-转 角 Beta turn/ %	无规则 卷曲 Ran- dom coil/%
<i>AsARF2</i>	Unigene 0019511	279-361	153-254	712-805	856	94 838.25	6.30	61.21	62.66	-0.640	18.11	14.84	4.21	62.85
<i>AsARF3a</i>	Unigene 0036962	266-347	140-241		745	82 021.18	7.63	56.87	73.32	-0.438	15.70	14.90	4.43	64.97
<i>AsARF3b</i>	Unigene 0020910	266-347	140-241	723-791	830	91 501.58	6.06	52.71	73.43	-0.489	17.59	15.30	3.73	63.37
<i>AsARF5a</i>	Unigene 0022590	255-332	123-225	841-913	948	105 213.38	5.65	56.18	77.10	-0.429	27.53	14.56	5.70	52.22
<i>AsARF5b</i>	Unigene 0015502	277-354	145-247	863-935	970	107 483.85	5.57	56.51	76.26	-0.434	27.84	14.23	5.57	52.37
<i>AsARF6a</i>	Unigene 0029811	266-343	134-236		806	89 208.34	7.11	66.72	72.00	-0.459	27.79	14.76	5.71	51.74
<i>AsARF6b</i>	Unigene 0021539	259-336	127-229		731	81 128.12	6.21	57.61	74.13	-0.438	25.99	13.54	3.28	57.18
<i>AsARF6c</i>	Unigene 0029821	259-336	127-229	681-776	776	86 515.03	5.60	62.52	72.59	-0.464	25.13	14.69	3.61	56.57
<i>AsARF6d</i>	Unigene 0021540	176-253	44-146	610-697	730	81 676.67	5.42	60.61	73.70	-0.447	27.40	13.56	3.97	55.07
<i>AsARF7</i>	Unigene 0012522	202-278	70-172	896-968	1007	112 510.14	6.30	73.07	75.75	-0.648	30.78	14.40	6.65	48.16
<i>AsARF16</i>	Unigene 0033933	288-371	120-221	595-676	677	73 853.45	7.20	52.70	71.58	-0.351	17.73	15.95	4.73	61.60

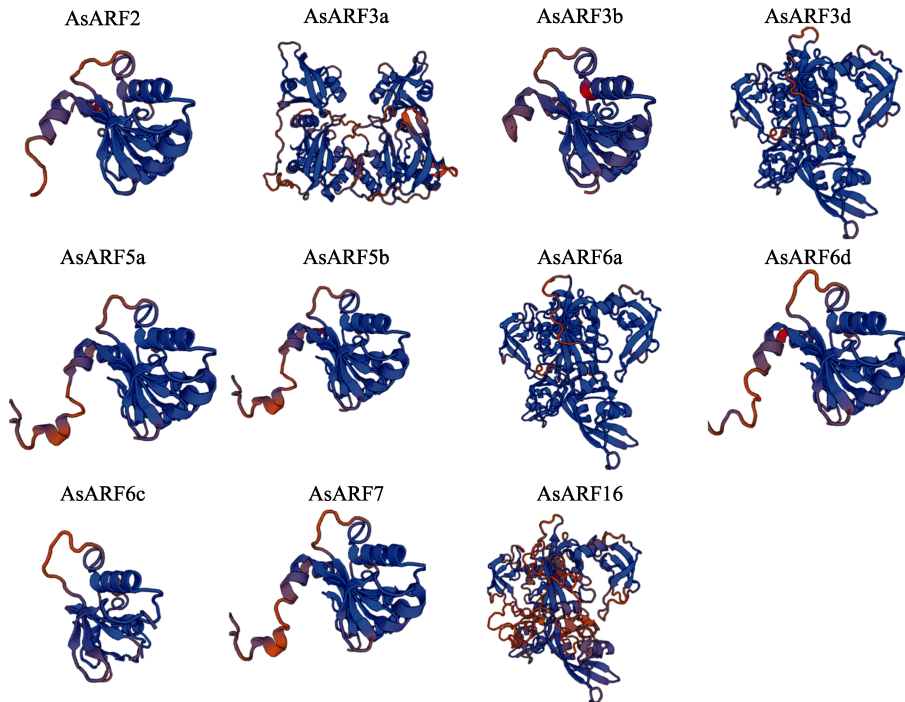


图 3 番荔枝 ARF 蛋白的三级结构  
Fig. 3 Tertiary structure of ARF protein in sugar apple

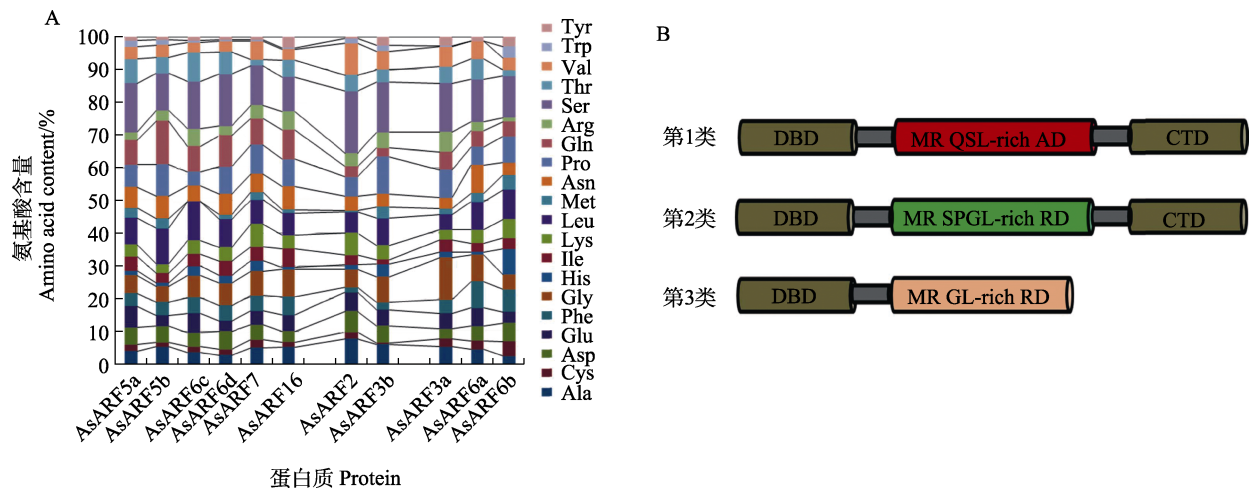
### 2.3 番荔枝 ARF 蛋白的氨基酸组成及分类

番荔枝 AsARF 蛋白的氨基酸组成如图 4A 所示，丝氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、亮氨酸、甘氨酸等在 AsARF 蛋白中的含量较高。根据中间区域结构域（MR）的氨基酸组成和是否存在 C-末端二聚化结构域（CTD），可以把 11 个 AsARF 分为三类（图 4B）。第 1 类包括 DNA 结合结构域（DBD）和 CTD 结构域，MR 结构域为激活域（AD）的 AsARF 蛋白，包括 AsARF5a、AsARF5b、AsARF6c、AsARF6d、AsARF7 和 AsARF16；第

2 类包括 DBD 结构域和 CTD 结构域，MR 结构域为抑制域（RD）的 AsARF 蛋白，包括 AsARF2 和 AsARF3b；第 3 类包括 DBD 结构域，MR 结构域为 RD 抑制域，且缺乏 CTD 结构域的 AsARF 蛋白，包括 AsARF3a、AsARF6a 和 AsARF6b。

### 2.4 亚细胞定位分析

转录因子通过与靶基因的启动子元件相结合，调节靶基因的转录表达，通常定位于细胞核中。通过在线软件 SoftBerry 分析亚细胞定位，结果如表 3 所示，11 个番荔枝 ARF 蛋白都为潜在



A: 番荔枝 ARF 的 MR 结构域的氨基酸含量；B: 番荔枝 ARF 蛋白结构。  
A: Amino-acid content of MR domains; B: The protein structure of AsARF proteins in sugar apple.

图 4 番荔枝 ARF 氨基酸组成和蛋白结构分析

Fig. 4 Analysis of amino acid content and classification of ARF proteins in sugar apple

表 3 番荔枝 ARF 基因家族蛋白亚细胞定位

Tab. 3 Subcellular localization of ARF genes family protein in sugar apple

基因 Gene	基因 ID Gene ID	细胞核 Nuclear	细胞膜 Plasma membrane	胞外 Extra cellular	细胞质 Cytoplasmic	线粒体 Mitochondrial	内质网 Endoplasmic reticulum	微体 Peroxisomal	高尔基体 Golgi	叶绿体 Chloroplast	液泡 Vacuolar
AsARF2	Unigene 0019511	9.55	0.00	0.37	0.00	0.00	0.00	0.03	0.05	0.00	0.00
AsARF3a	Unigene 0036962	9.39	0.03	0.47	0.02	0.00	0.00	0.04	0.05	0.00	0.00
AsARF3b	Unigene 0020910	9.46	0.02	0.43	0.00	0.00	0.00	0.04	0.06	0.00	0.00
AsARF5a	Unigene 0022590	9.28	0.08	0.50	0.07	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00
AsARF5b	Unigene 0015502	9.26	0.10	0.48	0.09	0.00	0.00	0.04	0.03	0.00	0.00
AsARF6a	Unigene 0029811	9.29	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.04	0.12	0.03	0.00
AsARF6b	Unigene 0021539	9.36	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.03	0.00
AsARF6c	Unigene 0029821	9.44	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.01	0.00
AsARF6d	Unigene 0021540	9.42	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.07	0.04	0.00	0.00
AsARF7	Unigene 0012522	9.34	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.04	0.08	0.00	0.00
AsARF16	Unigene 0033933	9.46	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00

的细胞核定位蛋白。随机选取 *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 构建亚细胞定位载体, 利用农杆菌介导的转化技术浸润本氏烟烟草叶片, 在激光共聚焦显微镜下对绿色荧光信号 (GFP) 进行观察。结果显示, *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 蛋白都定位在细胞核中 (图 5)。这一结果表明, 转录因子 *AsARF* 蛋白具有细胞核定位的特征。

### 2.5 番荔枝 ARF 基因家族在花发育不同阶段的表达分析

通过 qRT-PCR 技术分析了 *AsARF* 基因在花发育 4 个阶段的基因表达模式, 结果表明 *AsARF3a*、*AsARF3b*、*AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6a* 和 *AsARF7* 在花芽期表达量高, 在花蕾期、开花期、

开花前期的表达量呈下降趋势。*AsARF2* 和 *AsARF6b* 的表达量在花蕾期比较高, 在开花前期和开花期呈下降趋势。此外, *AsARF6c* 和 *AsARF6d* 在整个开花前期表现出较高的表达水平。而 *AsARF16* 在花芽期和开花期呈现高表达 (图 6)。

### 2.6 番荔枝 ARF 基因家族在正常花和畸形花中的表达分析

利用 qRT-PCR 分析 *AsARF* 基因在番荔枝正常花和畸形花中的表达, 结果发现, *AsARF2*、*AsARF3a*、*AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6b*、*AsARF6c* 和 *AsARF16* 基因在正常花中呈现高表达, 而 *AsARF3b*、*AsARF6a*、*AsARF6d*、*AsARF7* 则在畸形花中表达量更高 (图 7)。

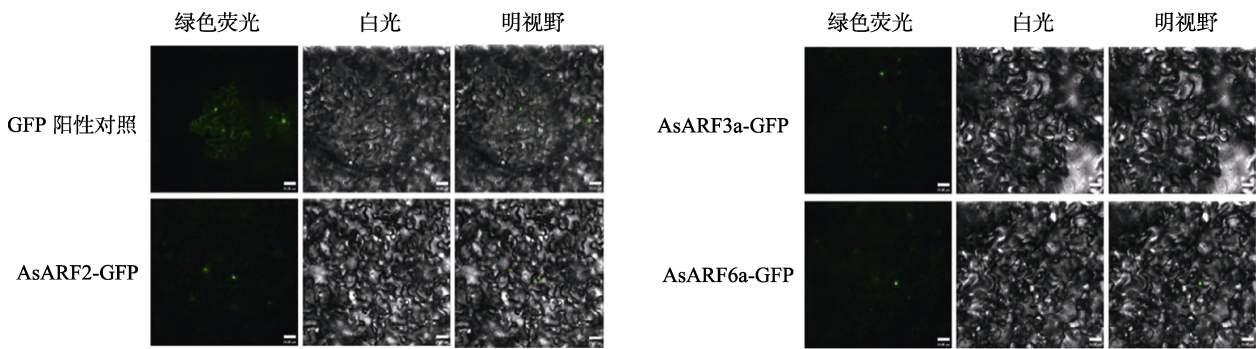


图 5 *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 蛋白的亚细胞定位

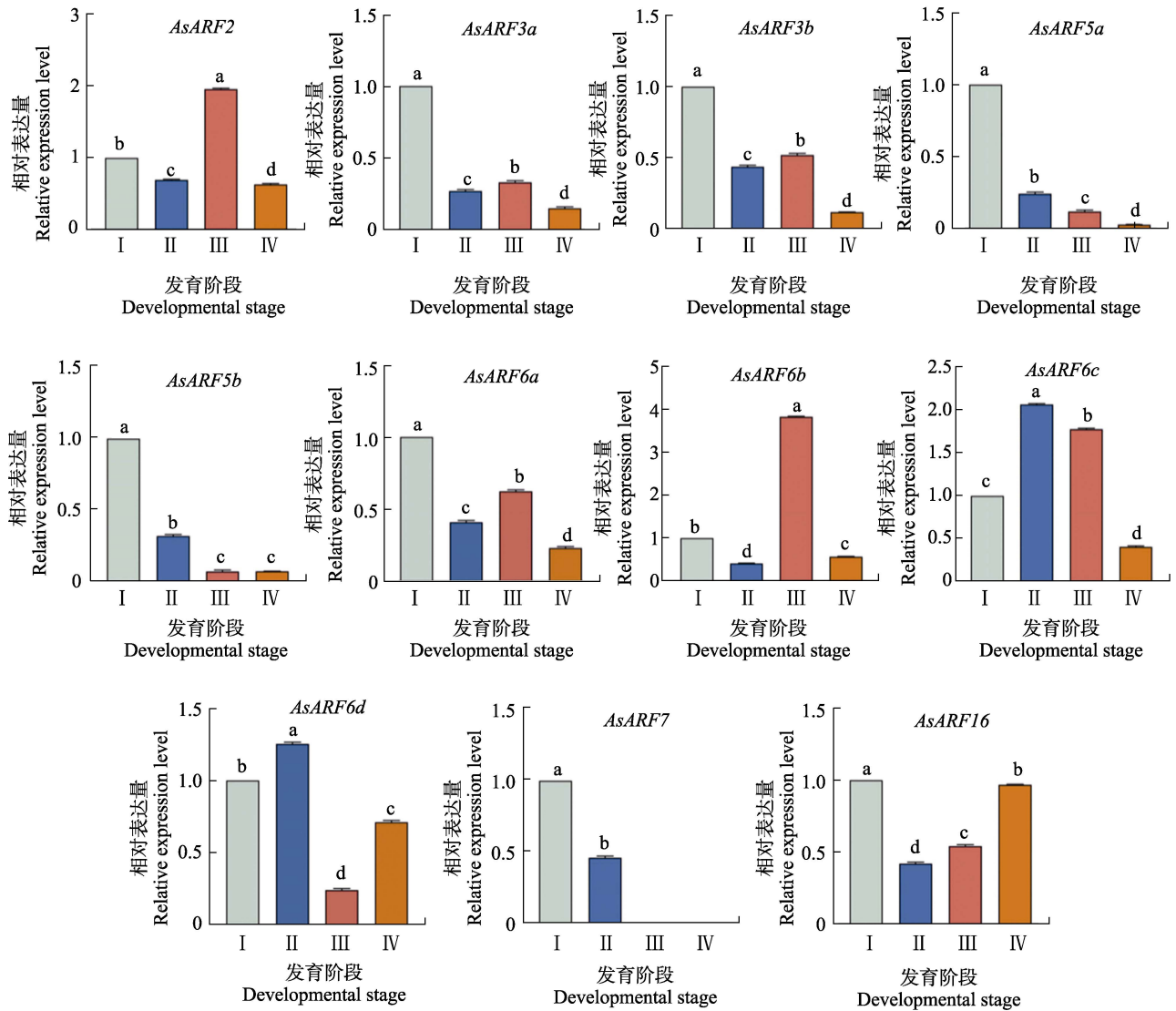
Fig. 5 Subcellular localization of *AsARF2*, *AsARF3a* and *AsARF6a* proteins in *N. benthamiana*

## 3 讨论

生长素作为一类植物生长发育相关的重要激素, 而其中生长素响应因子 ARF 是为植物生长素响应的关键调节因子之一, 也是核心的正负调控因子<sup>[9, 15]</sup>。通过对植物的 ARF 家族进行鉴定分析, 有助于深入研究 ARF 在植物生长发育各个环节的调控机制。近年来, 随着基因组测序技术的不断推进, 为基因家族分析提供了很大的便利性。但是番荔枝作为热带亚热带地区著名果树<sup>[1-2, 14]</sup>, 其基因组序列还未得到测序解析, 这在很大程度上限制了控制其重要性状基因的研究。因此从转录组测序数据获得相关基因家族成员成为研究的热点之一。

目前在番茄中发现了 17 个 ARF 家族成员<sup>[11]</sup>、黄瓜中 18 个<sup>[16]</sup>、苹果中 29 个<sup>[17]</sup>、番木瓜中 11 个<sup>[8]</sup>。本研究基于番荔枝花发育不同阶段转录组测序数据, 筛选并鉴定出番荔枝 ARF 转录因子家族成员 11 个。系统进化分析显示番荔枝和拟南芥

的 ARF 形成 6 对旁系同源基因对, 这为研究番荔枝 ARF 基因功能提供了有价值的信息。生物信息学分析显示番荔枝 ARF 蛋白的蛋白特性、氨基酸长度有较大差异, 说明番荔枝 ARF 家族蛋白的特性不一, 可能具有多样化的生物学功能。本研究鉴定的番荔枝 AFR 蛋白大部分含有 3 个保守结构域, 分别是 DNA 结合结构域 (DBD)、中间区域结构域 (MR) 和 C-末端二聚化结构域 (CTD), 但 *AsARF3a*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 等 3 个成员仅有 2 个保守结构域, CTD 结构域缺失, 上述特性与前人研究的番木瓜、荔枝等<sup>[8, 18-19]</sup> ARF 家族蛋白的性质一致。研究表明, DBD 结构域具有 DNA 结合活性, 可以与生长素反应基因启动子上的作用元件结合, 进而通过与 MR 结构域激活或抑制相关基因的表达。CTD 结构域是一个介导蛋白质-蛋白质互作的结构域, 另一个在生长素信号途径中起抑制作用的 AUX/IAA 蛋白中也具有类似结构域, 2 个蛋白可以通过该结构域的互作而形



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

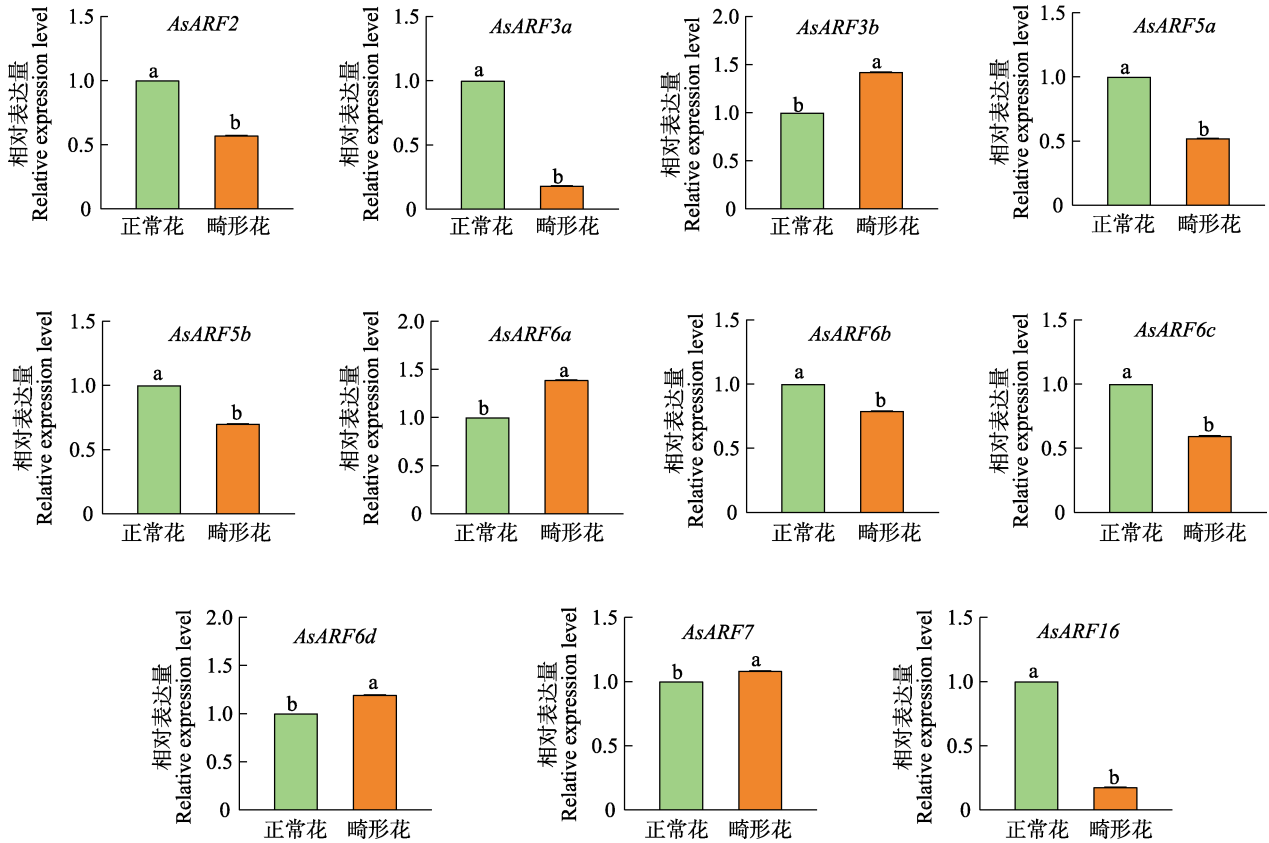
图 6 番荔枝 ARF 基因家族在花发育不同阶段的表达

Fig. 6 Expression of ARF gene family expression during different flower developmental stages in sugar apple

成 ARF-ARF、ARF-Aux/IAA 和 Aux/IAA-Aux/IAA 同源或异源寡聚体<sup>[8-9]</sup>。但番荔枝中 *AsARF3a*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 的 CTD 结构域缺失的 ARF 功能如何还有待进一步研究。

对番荔枝 ARF 编码蛋白二级结构进行预测后发现, 该基因编码的蛋白质中无规则卷曲所占比例最大, 其次是 $\alpha$ -螺旋; 在蛋白质三级结构中, 发现番荔枝 ARF 编码蛋白为多链折叠蛋白, 以无规则卷曲为主, 这与石榴和水仙<sup>[18-19]</sup>ARF 编码蛋白的二级、三级结构预测结果基本一致。根据 ARF 蛋白 MR 的氨基酸组成, 可以预测 ARF 为转录抑制子或转录激活子。前人研究发现 *AtARF1*、*AtARF2*、*AtARF3*、*AtARF4* 和 *AtARF9* 蛋白非保

守的中间区域富含甘氨酸 (G)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L) 和脯氨酸 (P) 残基, 能够发挥转录抑制作用, 为转录抑制子, 而 *AtARF5-8* 和 *AtARF19* 中间区域富含谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S) 和亮氨酸 (L) 残基, 发挥转录激活作用, 为转录激活子<sup>[20-22]</sup>。本研究中, *AsARF5a*、*AsARF5b*、*AsARF6c*、*AsARF6d*、*AsARF7* 和 *AsARF16* 蛋白的中间区域富含 Q、S、L, 推测这 6 个蛋白可能为转录激活子。而 *AsARF2*、*AsARF3a*、*AsARF3b*、*AsARF6a* 和 *AsARF6b* 这 5 个蛋白推测为转录抑制子。但是番荔枝 ARF 家族基因中是促进或抑制生长素响应基因表达的具体功能分析还有待进一步探究。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 7 番荔枝 ARF 基因家族在正常花和畸形花中的表达

Fig. 7 Expression of ARF gene expression between normal and malformation flowers in sugar apple

亚细胞定位预测结果显示, 番荔枝 ARF 蛋白主要定位在细胞核中, 具有转录因子的定位特征。对 *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 蛋白的亚细胞定位试验结果也显示, *AsARF2*、*AsARF3a* 和 *AsARF6a* 蛋白定位于细胞核, 这与其他物种 ARF 蛋白定位<sup>[23-24]</sup>基本一致。

ARF 家族基因在花发育的过程中也发挥着重要的作用, 拟南芥的 *AtARF2*、*AtARF5* 可以调节雌性和雄性配子体发育<sup>[25]</sup>, *AtARF2* 突变体表现出延迟开花的表型<sup>[26]</sup>。本研究中 *AtARF2* 的同源基因 *AsARF2* 主要在花蕾期表达, *AtARF5* 同源基因 *AsARF5a*、*AsARF5b* 主要在花芽期表达, 且 *AsARF2*、*AsARF5a* 和 *AsARF5b* 三个基因在正常花中的表达显著高于畸形花, 推测番荔枝 *AsARF2*、*AsARF5a* 和 *AsARF5b* 具有调控早期花发育和花器官的正常发育的功能。此外, 有报道拟南芥中 *AtARF3* 在花发育早期起到显著的作用<sup>[27]</sup>。番荔枝中 *AsARF3a* 和 *AsARF3b* 两个基因的表达主要集中在花芽期, 这说明 *AsARF3a* 和

*AsARF3b* 很可能也参与了早期花发育。在拟南芥中 *AtARF6* 还被证实能够促进雄蕊花丝伸长、花药开裂和雌核成熟<sup>[28]</sup>。在其他物种中, 多个 *AtARF6* 的同源基因得到了鉴定, 如辣椒 *CaARF6A*、*CaARF6B*、*CaARF6C*, 它们被证明参与了调控花发育与成熟过程<sup>[29]</sup>。在本研究中, *AsARF6a* 主要在花芽期高度表达, *AsARF6b*、*AsARF6c* 和 *AsARF6d* 则多集中于花蕾期和开花前期表达, 这在客观上证实了番荔枝这几个同源基因在维持花器官发育中起到一定的作用。同时 *AsARF6b*、*AsARF6c* 在正常花中表达量高, 而 *AsARF6a*、*AsARF6d* 在畸形花中表达量更高, 说明它们在花的正常发育中的具体功能可能不同。

#### 4 结论

ARF 家族在植物生长和发育的整个过程中都发挥着重要的作用, 本研究基于番荔枝花发育不同阶段转录组研究为背景, 对 ARF 家族基因进行筛选、生物信息学和表达模式分析。但由于番荔

枝基因组数据缺乏和转录组测序的局限性, 更多番荔枝 ARF 家族基因还有待进一步挖掘鉴定, 同时将来需要进行转基因试验等进行深入的功能验证分析, 以揭示 ARF 家族基因在花的正常发育中的具体功能。本研究结果为进一步了解番荔枝中 ARF 转录因子家族成员调控花发育的相关机制奠定基础, 并为解决番荔枝产业上出现的“花而不实”、结果率低等问题提供研究思路。

## 参考文献

- [1] 刘锴栋, 莫亿伟, 冯少娴, 吴婉仪, 黎海利, 钟军弟, 袁长春. 番荔枝花发育不同阶段的差异蛋白质组分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(1): 149-159.  
LIU K D, MO Y W, FENG S X, WU W Y, LI H L, ZHONG J D, YUAN C C. Comparative proteomic analysis in different development stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) flowers[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(1): 149-159. (in Chinese)
- [2] 刘锴栋, 黄素娜, 姜艳, 黎海利, 袁长春, 刘金祥, 陈燕. 番荔枝开花调控转录因子基因 *AsLEAFY* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(8): 1467-1476.  
LIU K D, HUANG S N, JIANG Y, LI H L, YUAN C C, LIU J X, CHEN Y. Cloning and expression analysis of flowering related transcription factor *AsLEAFY* from sugar apple[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(8): 1467-1476. (in Chinese)
- [3] 刘锴栋, 袁长春, 黎海利, 刘金祥, 陈燕, 莫亿伟, 李华富. 番荔枝 GA20 氧化酶基因的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51(10): 1697-1705.  
LIU K D, YUAN C C, LI H L, LIU J X, CHEN Y, MO Y W, LI H F. Cloning and expression analysis of GA20-oxidase gene from sugar apple (*Annona squamosa*) [J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(10): 1697-1705. (in Chinese)
- [4] LIU K D, LI H L, LI W J, ZHONG J D, CHEN Y, SHEN C J, YUAN C C. Comparative transcriptomic analyses of normal and malformed flowers in sugar apple (*Annona squamosa* L.) to identify the differential expressed genes between normal and malformed flowers[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17: 170.
- [5] 彭松兴, 林超明, 杨帅, 李建国. 阿蒂莫耶番荔枝人工授粉的进一步研究[J]. 福建果树, 2008(2): 1-3, 8.  
PENG S X, LIN C M, YANG S, LI J G. A further study on hand-pollination of *Annona atemoya* Hort[J]. Fujian Fruits, 2008(2): 1-3, 8. (in Chinese)
- [6] 邓穗生, 高爱平, 陈业渊. 6种番荔枝属果树雄蕊特性的研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(9): 1654-1658.  
DENG S S, GAO A P, CHEN Y Y. Characteristics of the stamens of six *Annona* spp.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(9): 1654-1658. (in Chinese)
- [7] GUILFOYLE T J, HAGEN G. Auxin response factors[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(5): 453-460.
- [8] LIU K D, YUAN C C, LI H L, LIN W H, YANG Y J, SHEN C J, ZHENG X L. Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.) [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 901.
- [9] 刘振华, 于延冲, 向凤宁. 生长素响应因子与植物的生长发育[J]. 遗传, 2011, 33(12): 1335-1346.  
LIU Z H, YU Y C, XIANG F N. Auxin response factors and plant growth and development[J]. Hereditas, 2011, 33(12): 1335-1346. (in Chinese)
- [10] RAHUL K, AKHILESH K T, ARUN K S. Genome-wide analysis of auxin response factor gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2011, 285: 245-260.
- [11] 杨泉, 任振新, 林冬波, 先志强, 李正国. 番茄 *SlARF2* 基因表达模式及其在果实发育中的功能分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(10): 1969-1974.  
YANG X, REN Z X, LIN D B, XIAN Z Q, LI Z G. The expression pattern of *SlARF2* in tomato and the function analysis in tomato fruit development[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(10): 1969-1974. (in Chinese)
- [12] 宋娟. 果梅 *PmARF* 基因的克隆及功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.  
SONG J. Isolation and functional analysis of *PmARF* gene in Japanese Apricot[D]. NanJing: NanJing Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [13] 郭勤卫, 李季, 崔利, 张停林, KERE G M, 陈劲枫. 黄瓜生长素响应因子 *CsARF10* 亚家族 3 个基因的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(6): 1071-1080.  
GUO Q W, LI J, CUI L, ZHANG T L, KERE G M, CHEN J F. Cloning and expression analysis of cucumber *CsARF10* genes subfamily[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(6): 1071-1080. (in Chinese)
- [14] 刘锴栋, 钟舒婷, 黎海利, 蒋边, 袁长春. 番荔枝花发育不同时期的数字基因表达谱分析[J]. 岭南师范学院学报, 2018, 39(3): 59-68.  
LIU K D, ZHONG S T, LI H L, JIANG B, YUAN C C. Digital gene expression analysis of different flower developmental stages in sugar apple (*Annona squamosa* L.) [J]. Journal of Lingnan Normal University, 2018, 39(3): 59-68. (in Chinese)
- [15] 张彦莘, 刘照坤, 朱旭东, 王晨, 李庆魁, 袁卫明, 娄晓鸣. 桃果实中 miR160a 与其靶基因 ARF 的鉴定及对 IAA 的响应分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(4): 613-622.  
ZHANG Y P, LIU Z K, ZHU X D, WANG C, LI Q K, YUAN W M, LOU X M. Identification of miR160a and its

- target gene ARFs in peach fruit and the response analysis of IAA[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(4): 613-622. (in Chinese)
- [16] 盛慧, 秦智伟, 李文滨, 周秀艳, 武涛, 辛明. 黄瓜生长素反应因子(ARF)家族鉴定及表达特异性[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(10): 1985-1994.  
SHENG H, QIN Z W, LI W B, ZHOU X Y, WU T, XIN M. Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) family in cucumber[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(10): 1985-1994. (in Chinese)
- [17] 李慧峰, 冉昆, 何平, 王海波, 常源升, 孙清荣, 程来亮, 李林光. 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.  
LI H F, RAN K, HE P, WANG H B, CHANG Y S, SUN Q R, CHENG L L, LI L G. Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(7): 1045-1054. (in Chinese)
- [18] 黄贤斌, 张太奎, 刘翠玉, 赵玉洁, 魏洪珉, 周润青, 苑兆和. 石榴 ARF 基因家族鉴定及表达分析[J]. *果树学报*, 2019, 36(1): 43-55.  
HUANG X B, ZHANG T K, LIU C Y, ZHAO Y J, WEI H M, ZHOU J Q, YUAN Z H. Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in *Punica granatum*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(1): 43-55. (in Chinese)
- [19] 李全超, 刘洋, 肖瑶宇, 李琳, 杨征帆, 陈晓静. 基于转录组的‘黄花2号’水仙 ARF 基因家族分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(3): 687-694.  
LI Q C, LIU Y, XIAO Y Y, LI L, YANG Z F, CHEN X J. Transcriptome-based analysis of the ARF gene family of *Narcissus tazetta* ‘Huanghua 2’[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(3): 687-694. (in Chinese)
- [20] TIWARI S B, HAGEN G, GUILFOYLE T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 533-543.
- [21] TIWARI S B, WANG X J, HAGEN G, GUILFOYLE T J. Aux/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13: 2809-2822.
- [22] WANG J W, WANG L J, MAO Y B, CAI W J, XUE H W, CHEN X Y. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204-2216.
- [23] HAO Y, HU G, BREITEL D, LIU M, MILA I, FRASSE P, FU Y, AHARONI A, BOUZAYEN M, ZOUINE M. Auxin response factor SIARF2 is an essential component of the regulatory mechanism controlling fruit ripening in tomato[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11: e1005649.
- [24] SHEN C J, WANG S K, BAI Y H, WU Y R, ZHAN S N, CHEN M, GUILFOYLE T J, WU P, QI Y H. Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(14): 3971-3981.
- [25] LIU Z N, MIAO L M, HUO R X, SONG X Y, JOHNSON C, KONG L J, SUNDARESAN V, YU X L. ARF2-ARF4 and ARF5 are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(1): 179-189.
- [26] ELLIS C M, NAGPAL P, YOUNG J C, HAGEN G, GUILFOYLE T J, REED J W. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2005, 132(20): 4563-4574.
- [27] ZHENG Y, ZHANG K, GUO L, LIU X, ZHANG Z. AUXIN RESPONSE FACTOR3 plays distinct role during early flower development[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2018, 13(5): e1467690.
- [28] FARCOT E, LAVEDRINE C, VERNOUX T. A modular analysis of the auxin signalling network[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122231.
- [29] 魏瑞敏, 谢玲玲, 欧阳娴, 张亚利, 戴雄泽, 刘峰. 辣椒 ARF 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(6): 1047-1058.  
WEI R M, XIE L L, OUYANG X, ZHANG Y L, DAI X Z, LIU F. Identification and expression analysis of ARF gene family in pepper[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2017, 37(6): 1047-1058. (in Chinese)