

• 药材与资源 •

滇龙胆 *ARF* 基因家族全基因组鉴定及表达分析

袁文雪¹, 梁艳丽¹, 陈丹¹, 赵艳¹, 徐梦恒¹, 王亚轩¹, 何凤春², 刘娟¹, 李炎¹, 袁文珏¹, 赵秀¹, 韩俊^{1*}

1. 云南农业大学西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心/云南农业大学云南省药用植物生物学重点实验室/云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201
2. 云县信合农业发展有限公司, 云南 临沧 675800

摘要: **目的** 通过对滇龙胆 *Gentiana rigescens* 中的生长素响应因子 (auxin response factors, ARFs) 家族成员进行全基因组鉴定和功能分析, 探究其在滇龙胆花冠感温开闭运动中的潜在功能。 **方法** 基于全基因组数据和转录组数据, 利用生物信息学方法分析滇龙胆 *ARFs* (*Gentiana rigescens ARFs*, *GrARFs*) 基因家族的理化性质、保守基序和基因结构、顺式作用元件以及进化分析, 采取实时荧光定量 (RT-qPCR) 技术分析其在滇龙胆不同开闭状态下的表达模式, 并通过亚细胞定位实验验证 *GrARF9* 的蛋白定位, 初步分析了 *GrARFs* 基因家族的生物学功能。 **结果** 在滇龙胆基因组中共鉴定到 21 条 *GrARFs*, 编码 612~1 065 个氨基酸, 相对分子质量在 68 082.29~118 117.97, 等电点范围为 5.52~8.43, 二级结构以无规则卷曲为主。系统进化树分析将滇龙胆中的 *ARFs* 分为 4 个亚群, 即 Group A、Group B、Group C、Group D; 大多数 *GrARFs* 含有 Auxin-resp 和 B3 DNA 结合结构域; *GrARFs* 启动子顺式作用元件含有丰富的激素响应与光响应原件; 21 条 *GrARFs* 不均匀分布在 8 条染色体上; 共线性分析显示滇龙胆中的 *GrARFs* 在双子叶植物中比较保守, 且与已经报道过功能的月季 *RhARFs* 有较多的共线性对; 21 个 *GrARFs* 基因在滇龙胆花冠感温过程中均存在差异表达; 亚细胞定位实验结果显示 *GrARF9* 蛋白定位于细胞核, 具有转录因子的核定位特征。 **结论** 初步阐明了 *GrARFs* 在滇龙胆感温运动中的表达模式, 为进一步研究 *GrARFs* 在滇龙胆花冠运动中的功能奠定了基础。

关键词: 滇龙胆; 感温运动; 生长素响应因子 (ARFs); 生物信息学分析; 基因表达分析

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)13-5203-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.022

Genome-wide identification and expression analysis of *ARF* gene family in *Gentiana rigescens*

YUAN Wenxue¹, LIANG Yanli¹, CHEN Dan¹, ZHAO Yan¹, XU Mengheng¹, WANG Yaxuan¹, HE Fengchun², LIU Juan¹, LI Yan¹, YUAN Wenjue¹, ZHAO Xiu¹, HAN Jun¹

1. National Local Joint Engineering Research Center for Germplasm Innovation and Utilization of Southwest Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agricultural University/Yunnan Provincial Key Laboratory of Medicinal Plant Biology, Yunnan Agricultural University/School of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
2. Yunxian Xinhe Agricultural Development Co., Ltd., Lincang 675800, China

Abstract: Objective By conducting a whole-genome identification and functional analysis of auxin response factors (ARFs) family members in *Gentiana rigescens*, this study investigate their potential roles in the thermosensitive corolla opening-closing movement of its corolla. **Methods** Based on whole-genome data and transcriptome data, bioinformatics methods were used to analyze the physicochemical properties, conserved motifs, gene structure, *cis*-acting elements, and evolutionary relationships of the *G. rigescens ARFs* (*GrARFs*) gene family. Real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) technology was employed to detect the expression patterns of *GrARFs* genes under different opening and closing states. Additionally, subcellular localization experiments were conducted to verify the protein localization of *GrARF9*, so as to preliminarily analyze the biological functions of the *GrARFs* gene family. **Results** A total of 21 *GrARFs* were identified

收稿日期: 2026-02-01

基金项目: 云南省科技厅创新引导与科技型企业培育计划 (202404BT090021); 云南省生物医药和大健康产业推进中心—重大科技专项计划 (202402AA310040); 兴滇人才计划—产业创新人才 (XDYC-CYCX-2022-0032); 迪庆州科技计划项目 (2025ZXN01)

作者简介: 袁文雪 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物学。E-mail: 2573880970@qq.com

*通信作者: 韩俊, 讲师, 研究方向为药用植物栽培与生化。E-mail: wsszhj@163.com

in the *G. rigescens* genome, encoding 612—1 065 amino acids. Their relative molecular weights ranged from 68 082.29 to 118 117.97, and their isoelectric points spanned 5.52—8.43. The secondary structure was dominated by random coils. Phylogenetic tree analysis classified the ARFs in *G. rigescens* into four subgroups, namely Group A, Group B, Group C, and Group D. Most *GrARFs* contained Auxin-resp and B3 DNA-binding domains. The promoter cis-acting elements of *GrARFs* were rich in hormone-responsive and light-responsive elements. The 21 *GrARFs* were unevenly distributed across eight chromosomes. Collinearity analysis revealed that the *GrARFs* in *G. rigescens* were relatively conserved among dicotyledonous plants and shared a considerable number of collinear pairs with the functionally characterized *ARFs* from *Rosa hybrida*. All 21 *GrARFs* genes exhibited differential expression during the thermosensitive process of *G. rigescens* corollas. Results of subcellular localization experiments showed that the GrARF9 protein was localized in the nucleus, displaying the nuclear localization characteristic of transcription factors. **Conclusion** The results of this study preliminarily clarify the expression pattern of *GrARFs* in the thermosensitive movement of *G. rigescens*, and lay a foundation for further research on the function of *GrARFs* in the corolla movement of *G. rigescens*.

Key words: *Gentiana rigescens* Franch.; thermosensitive movement; auxin response factors (ARFs); bioinformatics analysis; gene expression analysis

滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. 俗称坚龙胆、龙胆草、兰草根等, 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属 *Gentiana* L. 多年生草本植物, 主要分布于云南、四川、贵州和湖南等地^[1]。花朵独特的感温开闭运动是其适应高山温度波动环境的典型特征, 是研究植物感温和花冠运动的理想材料。已有研究证实, 细胞壁修饰是植物开花调控过程中的关键环节^[2-3]。本课题组前期针对滇龙胆的研究进一步发现, 其独特的感温花冠开闭运动同样与细胞壁的扩张修饰密切相关, 这提示细胞壁修饰可能在滇龙胆花器官运动调控中具有特殊作用。

生长素作为调控植物细胞扩张的核心激素, 被普遍认为是细胞壁生物合成上游调控的关键信号分子^[4]。Lehman 等^[4]的研究明确指出, 生长素可通过启动细胞壁松弛、渗透压调节等一系列生理过程, 驱动细胞形态发生改变, 进而诱导细胞伸长与膨胀; 而该激素信号通路的精准传递, 对植物花器官的正常发育至关重要。在生长素信号通路中, 生长素响应因子 (auxin response factors, ARFs) 是核心转录因子, 其通过特异性结合靶基因启动子区域的生长素响应元件 (AuxREs, 典型序列为 TGTCTC), 直接调控下游基因的转录过程, 是生长素信号传导的关键执行者^[5-6]。

目前, *ARF* 基因家族已在茶树 *Camellia sinensis* L.^[7]、颠茄 *Atropa belladonna* L.^[8]、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.^[9]、高粱 *Sorghum bicolor* L.^[10]、南瓜 *Cucurbita moschata* Duch. ex Lam.^[11] 等多种植物中完成鉴定。许多研究中表明 *ARF* 基因参与开花调控; 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 中, 生长素响应因子 AtARF8 可调控花瓣伸长, *arf8* 功能缺失突变体会导致生长素相关基因表达模式改变, 进而引

起花瓣细胞数量减少与细胞膨胀程度下降, 最终使花瓣大小显著减小^[12]; 在月季 *Rosa hybrida* E.H.L. Krause. 中, ARF2-MYB6 调控模块通过介导生长素信号影响花瓣扩张, *arf2* 突变体不仅开花速度显著延迟, 其花瓣大小也显著小于野生型对照^[13]; 此外, 基于生长素对睡莲 *Nymphaea coloratas* Peter. 花冠开合运动的调控作用, 研究者推测生长素响应相关基因 (如 *NcAUXs*、*NcARFs*、*NcYUCs* 等) 可能通过与细胞壁修饰过程相互作用, 共同调控花朵开合运动^[14]。Harada 等^[15]针对鸢尾花 *Iris tectorum* 的研究亦发现, 外源施加生长素类似物 1-萘乙酸 (NAA) 可显著促进花瓣扩张与花朵开放, 其调控机制被认为与“*AUX-IAA-ARF*”生长素信号调控网络密切相关。上述研究均表明, *ARF* 基因在植物开花运动调控中发挥重要作用。尽管 *ARF* 基因的开花调控功能已在多种植物中得到验证, 但在具有感温花冠运动特性的滇龙胆中, *ARF* 基因家族是否参与其独特的感温花冠运动调控, 目前尚无相关研究报道, 该科学问题的解析对阐明滇龙胆感温开花机制具有重要意义。

本研究对滇龙胆 *ARFs* (*Gentiana rigescens ARFs*, *GrARFs*) 基因家族进行全基因组鉴定、理化性质分析、保守结构域和多物种系统发育树构建等完善了 *GrARFs* 基因家族信息; 进一步分析 *GrARFs* 基因家族在不同滇龙胆感温运动状态花冠中的表达量, 构建了 *GrARF9* 亚细胞定位载体, 对其蛋白表达定位进行了分析, 初步探究 *ARFs* 基因家族在滇龙胆花冠感温运动中的功能。研究结果将为解析滇龙胆花冠运动的分子机制奠定基础, 也为进一步研究植物 *ARF* 基因家族功能提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试植物样本滇龙胆采自云南省临沧市云县漫湾镇酒坊村(23°56'~24°46'N, 99°43'~100°33'E, 海拔2440 m), 由昆明植物研究所杨文光研究员鉴定为龙胆科龙胆属植物滇龙胆 *G. rigescens* Franch.。坡面朝向阳坡, 土壤为红壤。于2023年11月6日—12月5日, 随着滇龙胆花朵开放进程, 采集早晨完全闭合花朵(EM, 7~8 °C)、中午感受高温半开半闭花朵(MH, 14~16 °C)、中午恒定高温完全开放花朵(AF, 22~24 °C)、下午感受低温半开半闭花朵(AH, 12~15 °C)和晚上恒定低温完全闭合花朵(MN, 7~8 °C)样品, 经液氮速冻, 保存于-80 °C超低温冰箱, 并对其转录组测序(NCBI 编号: PRJNA 1168881、PRJNA 1168883)。

1.2 主要仪器

A24812 型 PCR 扩增仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、DYCZ-20F 型电泳仪(北京东南仪诚实验设备有限公司)、UV-2450 型紫外可见分光光度计(上海岛津分析技术研发有限公司)、ZDP-250 型恒温培养摇床(浙江纳德科学仪器有限公司)、DR4V213204 型全自动凝胶成像系统仪(云南中科基因技术有限公司)、5424R 型冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、A24812 型荧光定量 QuanstudioTM 5 Real-Time PCR14 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、FLUOVIEW FV1000 激光扫描共聚焦生物显微镜(奥林巴斯有限公司)等。

2 方法

2.1 *GrARFs* 基因家族成员的全基因组鉴定

通过 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)获取 ARFs 的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM) PF06507 和 PF02309, 并通过 hmmsearch 工具对其进行分析; 将已知的拟南芥 AtARFs、水稻 OsARFs、草莓 FvARFs、月季 RhARFs 的氨基酸序列与滇龙胆基因组(课题组前期测序获得)进行 BLAST 比对; 对 HMM 模型和 BLAST 比对得到的基因序列取交集; 通过在线网站 SMART(<https://smart.embl.de/>)检验序列是否含有 ARF 基因家族特征结构, 去除无特征结构的序列, 得到候选滇龙胆 ARFs 家族成员。

2.2 *GrARFs* 基因家族蛋白质理化性质分析与亚细胞定位预测

利用 Expasy(<https://web.expasy.org/protparam/>)

在线软件分析 *GrARFs* 蛋白的氨基酸数目、相对分子质量、等电点、不稳定系数、亲水系数等理化性质, 通过 Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)网站预测亚细胞定位。利用 SOMPA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)在线工具预测 *GrARFs* 蛋白质二级结构。

2.3 *GrARFs* 基因家族系统发育树的构建

从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)分别下载拟南芥和水稻中已鉴定的 ARFs 蛋白序列, 而草莓、月季的蛋白序列则从 GDR(<https://www.rosaceae.org/>)数据库下载。使用 Mega-7 软件对滇龙胆与其他物种的 ARFs 蛋白, 包括拟南芥、水稻、草莓、月季 4 个物种的 ARFs 蛋白序列进行系统发育关系分析, 采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树(bootstrap=1 000)。

2.4 *GrARFs* 基因家族保守基序、保守结构域、基因结构分析

通过 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)在线软件分析 *GrARFs* 基因家族的保守基序, 利用 NCBI 中的 BatchCD Search 工具分析 *GrARFs* 基因家族的保守结构域, 并通过 TBtools 处理生成可视化图形。基因结构由 TBtools 的 Visualize Gene Structuer 工具进行分析。

2.5 *GrARFs* 基因家族的启动子顺式作用原件分析

利用 TBtools 从滇龙胆基因组数据库中获取 *GrARFs* 基因家族成员上游 2 000 bp 序列作为假定的启动子区域。并通过 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站分析启动子顺式作用元件, 最后通过 TBtools 将图形可视化。

2.6 *GrARFs* 基因家族成员的染色体定位和物种间共线性分析

利用滇龙胆基因组的注释文件获取滇龙胆 *GrARFs* 基因在染色体上的位置信息, 并通过 TBtools 可视化。

从滇龙胆基因组 FASTA 文件和 GFF 文件获取染色体长度信息及基因起始、终止信息。利用 MCScanX 程序获取滇龙胆与拟南芥、水稻(基因组从 NCBI 下载)和月季(基因组从 GDR 数据库下载)的共线性基因, 提取具有共线性关系的 ARF 家族成员信息, 使用 TBtools 对结果进行可视化。

2.7 植物总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

通过 Magen (广州美基生物科技有限公司) 的 HiPure Plant RNA Mini Kit 试剂盒提取不同状态下滇龙胆花朵的 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒 Vazyme R223-01 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+g DNA wiper) (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行反转录, 获得 cDNA 第 1 链。

2.8 *GrARFs* 基因家族成员表达模式的分析

利用 RT-qPCR 研究滇龙胆不同状态下 (EM、MH、AF、AH、MN) 基因表达情况, 选取滇龙胆 *Actin* 基因作为内参基因。根据已获取的 *GrARFs*

序列, 采用 Primer 3.0 软件设计 RT-qPCR 引物 (表 1), 反应为 20 μ L 体系, 包括 10 μ L 的 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 上、下游引物各 0.5 μ L, 模板 cDNA 0.5 μ L 和 8.5 μ L 的无酶水。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 循环 40 次, 每次循环后采集荧光; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、1 min, 95 $^{\circ}$ C、15 s 做熔解曲线分析, 每个反应 3 次生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量, 用 Prism 10 软件做表达量柱形图, SPSS 27 软件做显著性分析。

表 1 RT-qPCR 引物

Table 1 Primers for RT-qPCR

引物名称	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>Actin</i>	CGACAATCGCTTAGCCCTACGCCTT	CCAGCAAATCCAGCCTTGACCATTC
<i>GrARF9</i>	TCTTCATGGCGTTGAATGGC	ACGAAAGAATCTCCGGCAAC
<i>GrARF6</i>	TTTGTAAGTTGTTTCGGTTTCGC	TTGTTTGTGAACCTTTGTGCAG
<i>GrARF7</i>	TTTTTCCAGGCAACGGTGTTC	GCCGTGTTTCGTGTTCAAAC
<i>GrARF15</i>	ATCGAGCTGCAAATGGACAG	ACACCATTGAACCCGCATTG
<i>GrARF8</i>	ACCACCTTTTGTTCGCGTTC	ACTTGACGCTTGGTCAACAC
<i>GrARF16</i>	GGTGCAATGGTGAAAATGCC	ACAAAATGAGCGGCGGAATC

2.9 *GrARF9* 亚细胞定位载体构建

将从滇龙胆基因组中获得的 *GrARF9* 的 CDS 序列去除终止密码子, 再利用 Snapgene 设计 *GrARF9* 带有 pCAMBIA1300-GFP 同源臂的特异性引物, 上游引物序列 (5'-3'): GACGAGCTC-GGTACCCGGGGAATGGCAATTAGAGGTCATTTCTCTCA, 下游引物序列 (5'-3'): CTCACCTGT-CGACTCTAGAGGAGTCTTCACAATTTCCAGGG-TTAAAC, 以滇龙胆 cDNA 作为模板, 利用高保真酶 (2x Phanta Max Master Mix, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 对基因序列进行扩增。反应体系: cDNA 3 μ L, 前引物 F、后引物 R 各 2 μ L, 酶 25 μ L, 超纯水补足 50 μ L。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C、3 min; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 58 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、90 s, 35 循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min, 10 $^{\circ}$ C 保存。扩增的目的基因经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 最后将对应条带的目的基因进行胶回收。

将 pCAMBIA1300-GFP 表达载体用限制性内切酶 *Bam*H I 进行单酶切后获得线性化载体, 将目的基因与线性化载体在无缝克隆酶的催化下于 50 $^{\circ}$ C、50 min 条件下进行连接, 反应完成后将重组产物转化到大肠杆菌感受态 DH5 α 。通过菌落 PCR 和测序 (北京擎科生物科技有限公司昆明分公司)

分析鉴定阳性克隆, 获得重组表达载体 pCAMBIA-1300-GFP-*GrARF9*。

2.10 *GrARF9* 蛋白亚细胞定位分析

将上述获得的 pCAMBIA1300-GFP-*GrARF9* 重组载体转化农杆菌 GV3101 感受态, 通过菌液 PCR 获得阳性菌株。接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中继续培养至 A_{600} 为 0.6 左右, 离心收集菌体沉淀。用现配的侵染液 (每 100 mL 侵染液中分别含有乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 100 μ mol/L、MgCl₂ 10 mmol/L、MES 10 mmol/L) 重悬菌体沉淀至 A_{600} 约为 0.6, 室温避光静置 3 h 后侵染本氏烟草叶片, 使 pCAMBIA1300-GFP-*GrARF9* 在烟草表皮细胞中瞬时表达。同时, 转化 pCAMBIA1300-GFP 空载质粒为对照。侵染后的本氏烟草继续培养 2 d, 取菌液侵染区域叶片在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光信号在烟草表皮细胞中的分布。

3 结果与分析

3.1 *GrARFs* 基因家族鉴定与蛋白理化性质分析

本研究从滇龙胆基因组鉴定出 21 个 *GrARFs* 基因, 利用在线软件 ExPasy-ProtParam 分析 21 个 *GrARFs* 的蛋白理化性质, 结果如表 2 所示, 其相对分子质量在 68 082.29~118 117.97, 编码氨基酸长度为 613~1 065 个氨基酸, 等电点范围为 5.52~

表2 GrARFs 蛋白理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of GrARFs protein

名称	基因ID	相对分子质量	等电点	氨基酸数量/aa	不稳定系数	亲水系数	亚细胞定位
GrARF1	Grig03G002333.t1	68 291.36	6.07	613	57.62	-0.451	Nucleus
GrARF2	Grig03G002330.t1	70 492.31	6.14	633	62.93	-0.529	Nucleus
GrARF3	Grig08G001798.t1	86 174.98	5.98	770	56.29	-0.592	Nucleus
GrARF4	Grig01G001651.t1	93 390.37	6.24	830	56.57	-0.597	Nucleus
GrARF5	Grig05G001875.t1	89 002.28	8.43	809	54.75	-0.490	Nucleus
GrARF6	Grig03G000926.t1	93 525.48	6.60	842	48.54	-0.493	Nucleus
GrARF7	Grig03G000943.t1	98 471.22	7.74	879	49.10	-0.572	Nucleus
GrARF8	Grig01G005557.t1	94 684.18	5.52	853	55.02	-0.434	Nucleus
GrARF9	Grig05G004110.t1	105 037.52	6.93	948	59.33	-0.378	Nucleus
GrARF10	Grig13G001434.t1	103 023.13	5.90	929	58.10	-0.360	Nucleus
GrARF11	Grig03G004029.t1	101 044.34	6.28	900	62.44	-0.401	Nucleus
GrARF12	Grig02G002905.t1	72 721.34	6.98	653	56.33	-0.500	Nucleus
GrARF13	Grig06G003364.t1	74 068.75	6.35	666	53.05	-0.509	Nucleus
GrARF14	Grig10G001810.t1	72 986.35	6.06	653	47.44	-0.515	Nucleus
GrARF15	Grig03G001006.t1	77 549.52	7.58	707	43.68	-0.355	Nucleus
GrARF16	Grig01G002261.t1	71 996.62	6.77	645	46.72	-0.379	Nucleus
GrARF17	Grig02G001594.t1	68 082.29	7.23	613	48.67	-0.355	Nucleus
GrARF18	Grig02G003162.t1	67 320.42	6.39	612	42.10	-0.393	Nucleus
GrARF19	Grig05G000270.t1	111 581.37	6.33	1 004	65.07	-0.626	Nucleus
GrARF20	Grig13G002450.t1	118 117.97	5.99	1 065	59.72	-0.614	Nucleus
GrARF21	Grig03G001035.t1	73 048.43	6.64	662	46.25	-0.365	Nucleus

8.43, 21 个 GrARFs 不稳定系数均>40, 属于不稳定蛋白; GrARFs 的亲水性范围在-0.626~-0.355, 说明在滇龙胆中鉴定出来的 21 条 ARFs 均为亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示滇龙胆的 ARFs 蛋白均定位于细胞核。

3.2 GrARFs 家族蛋白二级结构分析

利用 TMHMM-2.0 进一步对 GrARFs 蛋白的二

级结构进行分析, 由表 3 可知, GrARFs 家族成员有 α -螺旋、延伸链和无规则卷曲 3 种结构元件, 无 β -折叠, 其中无规则卷曲的占比最大, 占 44.63%~82.16%, 为 GrARFs 家族主要元件。无规则卷曲为 mRNA 中的不稳定区域, 该区域内的碱基易发生突变引起 mRNA 二级结构的变化, 故推测不规则卷曲越多, 该家族基因的功能不稳定性也越高。

表3 GrARFs 蛋白质二级结构分析

Table 3 Secondary structure analysis of GrARFs protein

蛋白名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸链/%	无规则卷曲/%
GrARF1	14.68	0.00	13.54	71.78
GrARF2	16.11	0.00	11.37	72.51
GrARF3	14.68	0.00	9.35	75.97
GrARF4	16.27	0.00	10.48	73.25
GrARF5	15.08	0.00	11.62	73.30
GrARF6	15.91	0.00	10.69	73.40
GrARF7	14.79	0.00	11.15	74.06
GrARF8	14.42	0.00	9.61	75.97
GrARF9	17.83	0.00	11.81	70.36
GrARF10	11.95	0.00	10.76	77.29
GrARF11	17.89	0.00	10.11	72.00
GrARF12	17.15	0.00	13.32	69.53
GrARF13	16.22	0.00	13.21	70.57
GrARF14	15.62	0.00	15.47	68.91
GrARF15	15.84	0.00	12.87	71.29
GrARF16	15.81	0.00	14.57	69.61
GrARF17	16.80	0.00	14.52	68.68
GrARF18	39.41	0.00	15.95	44.63
GrARF19	12.65	0.00	9.46	77.89
GrARF20	11.08	0.00	6.76	82.16
GrARF21	14.50	0.00	13.29	72.21

3.3 *GrARFs* 基因家族系统发育分析

为了研究 *GrARFs* 基因家族的进化关系, 将滇龙胆 *ARFs* 蛋白与拟南芥、水稻、草莓、月季 4 个物种的 *ARFs* 蛋白进行系统发育分析。结果如图 1 所示, 植物中的 *ARFs* 蛋白序列可以分为 Group A、Group B、Group C、Group D 4 大类。进一步统计各类群成员数量发现, 不同类群的 *ARFs* 蛋白丰度存在显著差异: D 组成员最多, 包含 26 个家族成员, 其次为 C 组, 有 23 个成员,

A 组有 17 个成员, 而 B 组仅有 8 个成员, 这种成员数量的不均衡分布, 可能反映了不同类群 *ARFs* 基因在长期进化过程中, 因适应植物生长发育需求 (如激素响应、器官发生、胁迫耐受等) 而发生了差异化的扩增或保留事件。拟南芥的 *ARFs* 蛋白分布于所有组别中, 表明所有 *GrARFs* 基因在拟南芥基因组中都有同源序列, 滇龙胆 *GrARFs* 基因家族与拟南芥 *ARFs* 基因家族具有共同的进化祖先。

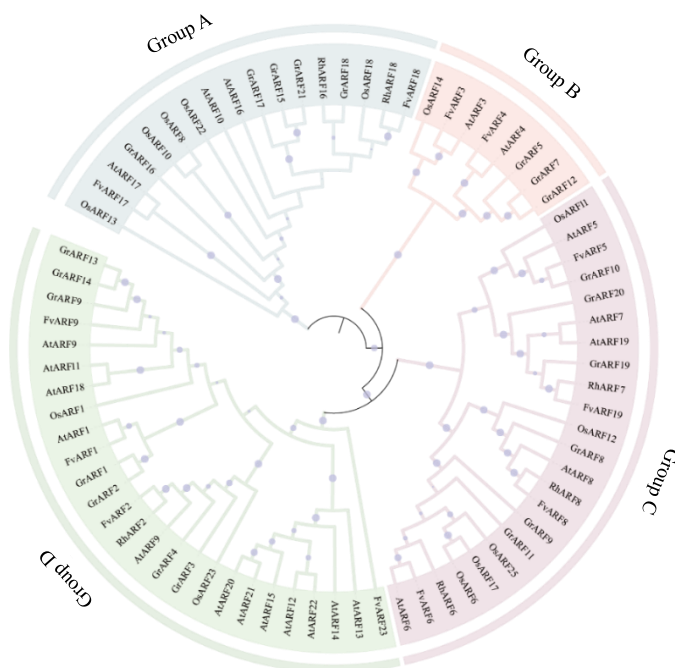


图 1 *GrARFs* 基因家族的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *GrARFs* gene family

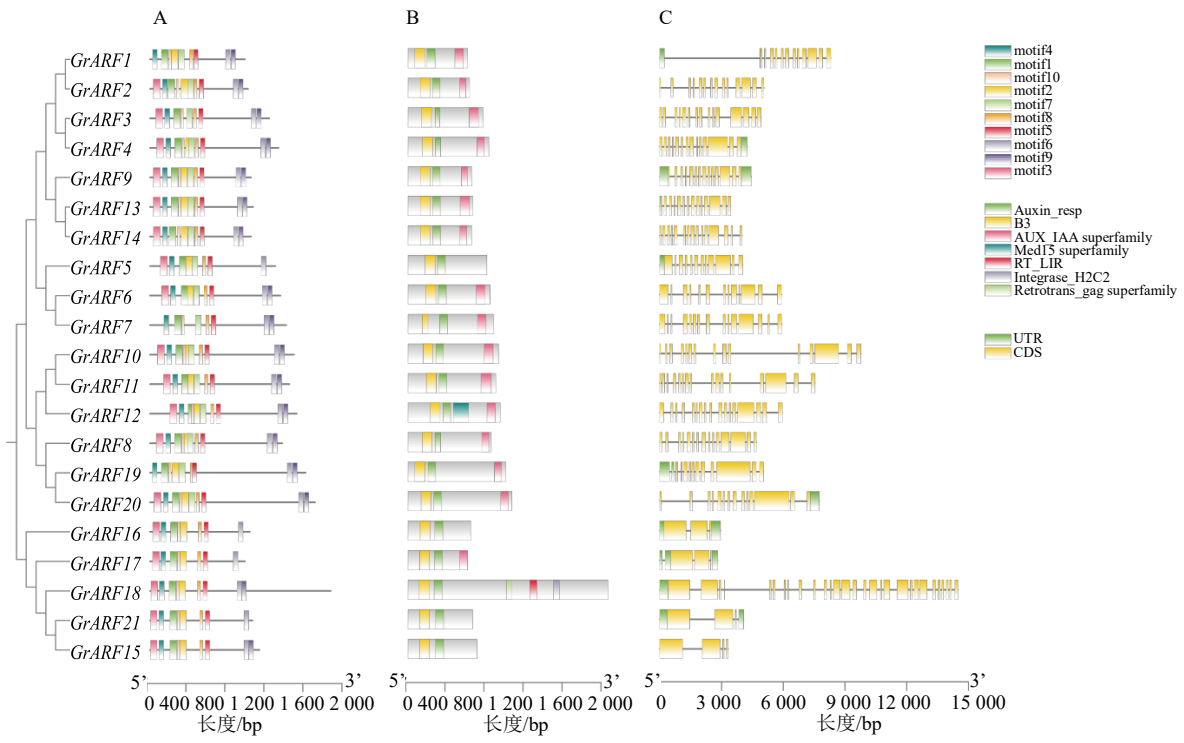
3.4 *GrARFs* 基因家族保守基序、保守结构域、基因结构分析

采用 MEME 在线软件对滇龙胆 *ARFs* 家族基因进行 Motif 结构分析, 发现 *GrARFs* 基因家族共有 8~10 个数量不等的基序, 其中 *GrARF5*、*GrARF7*、*GrARF16*、*GrARF17*、*GrARF21* 有 8 个 Motif, 其余 *GrARFs* 的 motif 数量为 9 或 10 个 (图 2-A)。而 Motif 4 和 Motif 1、Motif 5、Motif 8 在所有的 21 个 *GrARFs* 基因中均有出现, 表明其可能是维持 *ARFs* 家族核心功能的关键结构元件。多数滇龙胆 *ARFs* 家族基因含有 3 个保守结构域, 分别为“Auxin-resp”“B3”“AUX-IAA superfamily”结构域, 表明这 3 个结构域是维系滇龙胆 *ARFs* 家族基因基本功能的核心元件。与家族多数成员的结构域组成不同, 2 个特定基因呈现出结构域的特异性拓展: *GrARF12* 基因在

家族共有保守结构域基础上, 额外携带“Med15 superfamily”结构域; *GrARF18* 基因则以“Auxin-resp”“B3”2 个家族核心结构域为基础, 新增“Retrotransposon superfamily”“RT-LTR”“Integrase-H2C2”3 个独特结构域, 表明这 2 个基因在家族成员中存在功能分化的潜在特征 (图 2-B)。从基因结构上看, *GrARFs* 的非翻译区数量为 0~3 个, 其中 *GrARF1*、*GrARF4*、*GrARF13*、*GriARF5*、*GrARF20*、*GrARF18* 含有 1 个非翻译区, *GrARF9*、*GrARF19*、*GrARF16* 有 2 个非翻译区, *GrARF17*、*GrARF21* 有 3 个非编码区, 其余基因无非翻译区 (图 2-C)。

3.5 *GrARFs* 家族基因启动子顺式作用原件分析

选取滇龙胆 *GrARFs* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子序列, 利用 PlantCARE 分析基因启动子序列中顺式作用元件的组成。结果如图 3 所示,



A-保守基序; B-保守结构域; C-内含子与外显子结构。

A-conserved motif; B-conservative structural domain; C-intron and exon structures.

图2 *GrARFs* 保守基序、保守结构域和基因结构

Fig. 2 Conserved motifs, conservative structural domains, and gene structure of *GrARFs*

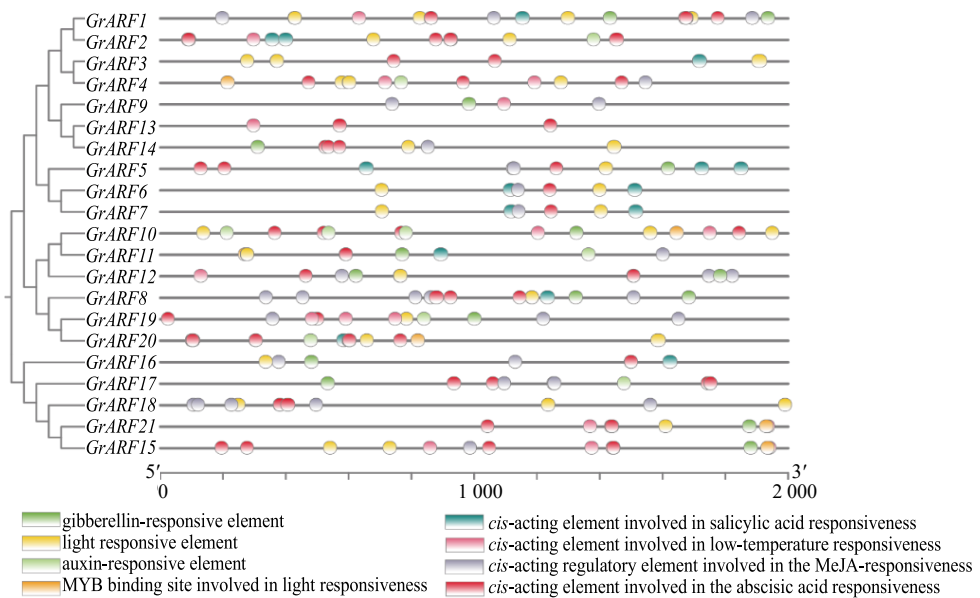


图3 *GrARFs* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 3 Analysis of *cis*-acting elements of *GrARFs* gene promoter

GrARFs 基因家族中存在多种顺式作用元件, 按其响应类型功能可划分为赤霉素、生长素、水杨酸、茉莉酸甲酯、脱落酸等丰富的激素响应原件, 表明了 *GrARFs* 家族基因的表达调控可能与上述多种激

素的信号响应过程相关。进一步的元件分布分析显示, 在脱落酸响应元件方面, 除基因 *GrARF9* 外, 其余所有 *GrARFs* 家族基因的启动子中均检测到丰富的该类元件, 表明脱落酸响应原件可能是该基因

家族的核心原件。值得注意的是大量低温响应元件和光响应元件也出现在大多数基因的启动子区域，结合滇龙胆花冠具有感温开闭的生物学特性，推测 *GrARFs* 家族基因的表达可能受温度与光照信号的调控，并可能参与调控滇龙胆花冠的感温开闭过程。

3.6 *GrARFs* 家族基因染色体定位和物种内共线性分析

通过染色体定位分析结果（图 4）可知，滇龙胆 *ARFs* 家族的 21 个基因成员在基因组中的分布呈现出显著的不均匀性，这些基因共定位于 8 条不同的染色体上，主要分布在高基因密度的染色体的两端，其可能与染色质的开放状态及基因表达活性存在一定关联。3 号染色体分布的 *GrARFs* 基因数量最多，而在其余 7 条携带 *GrARFs* 基因的染色体上，基因分布则相对稀疏，每条染色体仅含有 1~3 个家族成员，呈现出分散分布的特点。这种不均匀的分布格局很可能是滇龙胆在长期进化过程中，染色体发生片段复制事件时存在不均匀性所致一部分染色体区域的片段复制事件更为频繁，导致基因在

特定染色体上发生累积，而其他区域的复制活动相对较少，最终形成了当前 *GrARFs* 家族基因在染色体上的差异化分布特征。

物种内共线性分析显示（图 4），位于 3 号染色体上的 *GrARF2* 和 *GrARF1* 为串联重复基因；染色体上还存在 5 对片段复制基因，包括 *GrARF16* 和 *Grig07G004096.t1*、*GrARF15* 和 *GrARF21*、*Grig13G002065.t1* 和 *GrARF17*、*GrARF6* 和 *GrARF7*，*GrARF18* 和 *GrARF15*，而 *GrARF16* 和 *GrARF17* 的共线性基因 *Grig07G004096.t1* 和 *Grig13G002065.t1* 未在 *GrARFs* 家族鉴定到，可能 *GrARF16* 和 *GrARF17* 在进化过程中功能出现了分化。为研究 *GrARFs* 家族在进化过程中是否收到自然选择作用，对片段复制基因的非同义替换率 (K_a)、同义替换率 (K_s)、进化指数 (K_a/K_s) 进行计算分析， K_a/K_s 值大于、等于和小于 1 分别说明基因受到正向、中性和纯化选择^[16]。结果如表 4 所示，*GrARFs* 基因家族同源基因对 K_a/K_s 值均小于 1，表明滇龙胆 *ARFs* 在进化过程中消灭了有害突变位点。

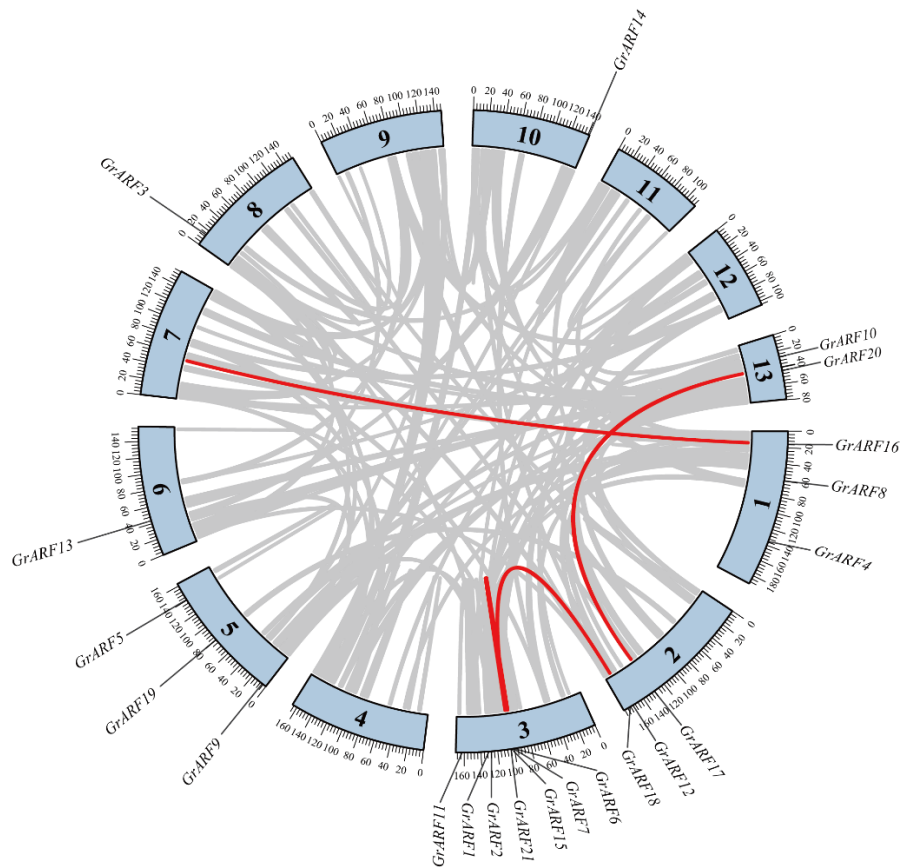


图 4 *GrARFs* 基因家族成员的染色体定位

Fig. 4 Chromosome localization of *GrARFs* gene family members

表 4 *GrARFs* 基因家族进化选择压力分析
Table 4 Evolutionary selection pressure analysis of *GrARFs* gene family

基因1	基因2	K_a	K_s	K_a/K_s
<i>GrARF16</i>	<i>Grig07G004096.t1</i>	0.179 950 231	0.912 580 024 1	0.197 188 440
<i>GrARF15</i>	<i>GrARF21</i>	0.002 624 818	0.015 393 613 5	0.170 513 448
<i>Grig13G002065.t1</i>	<i>GrARF17</i>	0.345 250 141	1.840 157 574 0	0.187 619 879
<i>GrARF6</i>	<i>GrARF7</i>	0.030 236 542	0.075 273 414 0	0.401 689 528
<i>GriARF18</i>	<i>GrARF15</i>	0.141 180 231	0.723 127 700 0	0.195 235 545

3.7 *GrARFs* 家族基因物种间共线性分析

为探究滇龙胆 *ARFs* 家族基因的进化保守性及物种间亲缘关系,本研究利用 MCScanX 软件对滇龙胆、拟南芥、水稻、月季的全基因组数据进行 *ARFs* 家族基因共线性分析。结果显示,滇龙胆与这 3 个物种之间存在不同程度的共线性关系。由图 5 可知,在滇龙胆与拟南芥之间共检测到 8 条同源基因对,与水稻有 1 条同源基因对,和月季有 14 条同源基因对,总体来看,滇龙胆与双子叶植物之间的共线性程度相对较高,而与单子叶植物水稻之间的共线性程度较低,这一现象表明, *GrARFs* 家族基因在双子叶植物的进化

历程中可能具有较高的结构保守性和功能稳定性。值得关注的是,滇龙胆与月季的 *ARFs* 基因共线性关联最为紧密(14 对同源基因),此前,CHen 等^[13]已证实,月季中的生长素响应因子 *RhARF2* 是调控花瓣扩张的关键调控因子,该基因可通过响应生长素信号调控花瓣生长,进而影响开花进程。结合本研究中滇龙胆与月季 *ARFs* 基因的高共线性特征,推测 *GrARFs* 家族基因可能同样具备响应生长素信号、促进花瓣扩张的功能,并可能通过这一通路参与调控滇龙胆特有的感温开闭运动,为后续解析滇龙胆花冠运动的分子机制提供了重要线索。

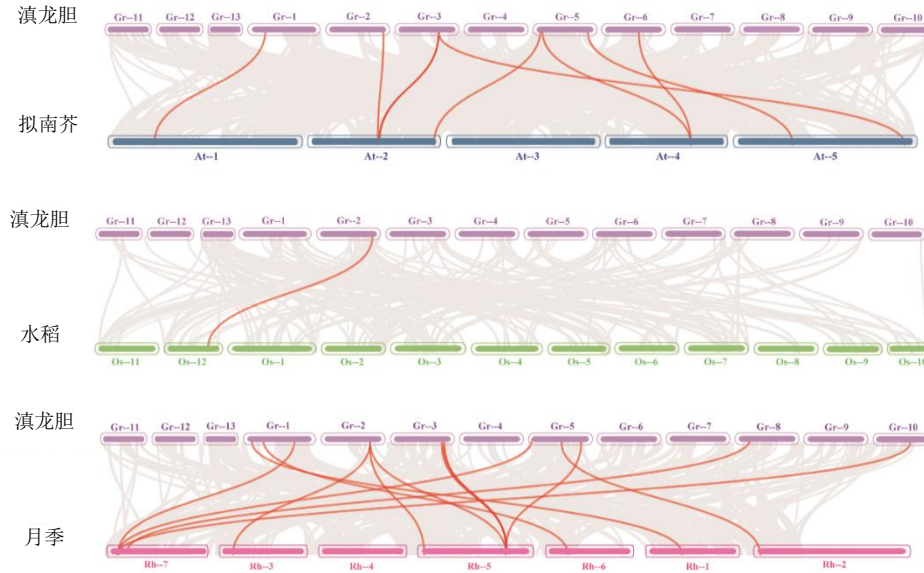


图 5 *GrARFs* 基因家族的种间共线性

Fig. 5 Interspecific collinearity of *GrARFs* gene family

3.8 *GrARFs* 家族基因在花冠运动中的特异性表达

GrARFs 基因家族成员大部分具有感温运动趋势,在不同运动状态下,其表达量在花冠中呈动态分布。根据 *GrARFs* 在滇龙胆感温开闭运动中的表达情况,可将这些基因分为 4 类,如图 6 所示, I 类包含 9 个基因 (*GrARF4*、*GrARF10*、*GrARF9*、*GrARF17*、*GrARF20*、*GrARF3*、*GrARF15*、*GrARF1*、

GrARF11),滇龙胆花朵在感受温度升高和感受温度降低时基因表达量同时降低; II 类包含 7 个基因 (*GrARF6*、*GrARF21*、*GrARF7*、*GrARF19*、*GrARF12*、*GrARF13*、*GrARF16*),花朵在感受温度升高和感受温度降低时基因表达量同时升高; III 类包含 3 个基因 (*GrARF5*、*GrARF2*、*GrARF8*),花朵在感受温度升高时表达量升高,直至 AF 状态时达到最高,

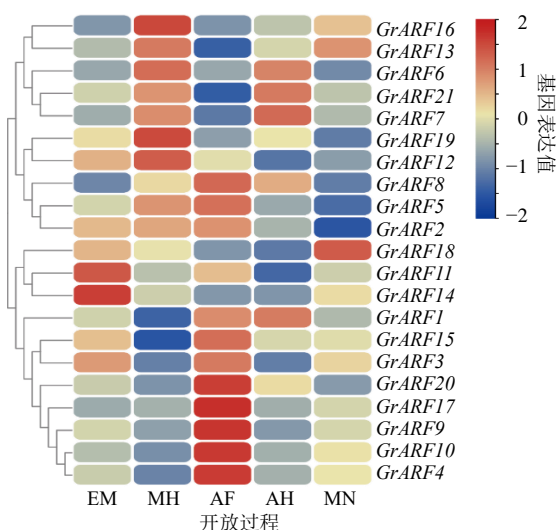


图6 *GrARFs* 在滇龙胆花冠开放过程中的差异表达
Fig. 6 Differential expression of *GrARFs* during corolla movement in *G. rigescens*

再次感受温度降低闭合时表达量下降，直至 MN 状态时降到最低；IV类包含 2 个基因 (*GrARF14*、*GrARF18*)，与III类感温运动完全相反，花朵在感受温度升高时表达量下降，直至 AF 时降到最低，再次感受温度降低闭合时表达量上升，直至 MN 状态时达到最高。由此可推测，*GrARFs* 的表达量随花朵开放的不同状态而变化，进而在滇龙胆花冠感温运动中发挥功能。

通过对差异表达倍数为 1.5 倍以上的基因进行表达量测定表明，如图 7 所示，*GrARF9* 的表达量在早晨的 EM 状态到上午温度升高的 MH 状态下表

达量显著降低，到中午花朵 AF 状态高温恒定时，表达量上升，下午降温后花朵重回半开半闭状态，直至 MN；*GrARF6*、*GrARF16*、*GrARF7*、*GrARF8* 4 个基因的表达量从 EM 到 MH 上午温度升高时的半开半闭状态下表达量升高，到 AF 温度恒定高温时，表达量下降；而 *GrARF15* 的表达量则是随着温度升高而升高，直至 AF 时达到最大值，当再次感受温度降低后表达量随之下降。

3.9 *GrARF9* 的蛋白定位分析

GrARF9 基因的表达量变化在滇龙胆感温运动中的 *GrARFs* 家族中表达量变化最明显，因此对 *GrARF9* 进一步进行亚细胞定位分析。通过转化本氏烟草叶片，进行亚细胞定位。结果显示 (图 8)，pCAMBIA1300-GFP-*ARF9* 携带 GFP 与细胞核定位染料蓝色荧光 DAPI 重合，且仅在细胞核中观察到 GFP，表明 *GrARF9* 蛋白定位于细胞核。

4 讨论

龙胆科植物普遍存在花冠运动现象。早在 1926 年就有报道龙胆科植物在开花过程中出现花朵暂时闭合现象^[17]；2001 年再次报道，在雷雨即将来临的几分钟内，高山龙胆直立管状花关闭，在阳光直射后重新开放^[18]；2006 年 Kozuharova 等^[19]描述了九种龙胆属植物的花冠运动，同年，He 等^[20]又对授粉后永久性闭合发育的现象进行研究，推测这种闭合能保护雄蕊或柱头上的花粉粒，提高雄蕊和雌蕊的适合度。已有研究表明，滇龙胆花朵存在高温开放、

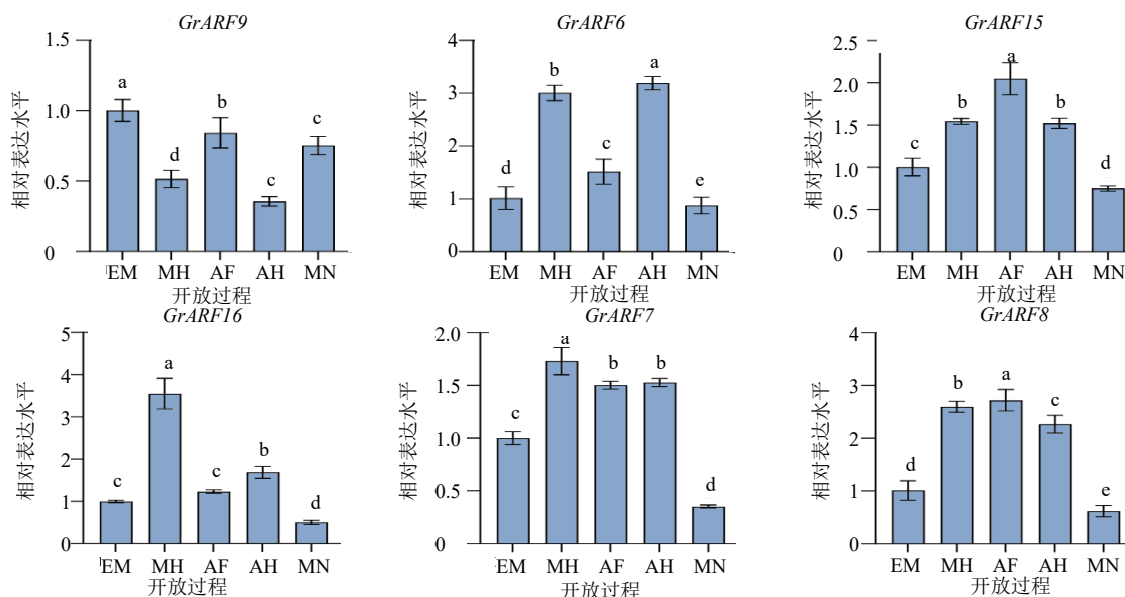


图7 滇龙胆 *GrARFs* 的表达水平

Fig. 7 Expression level of *GrARFs* in *G. rigescens*

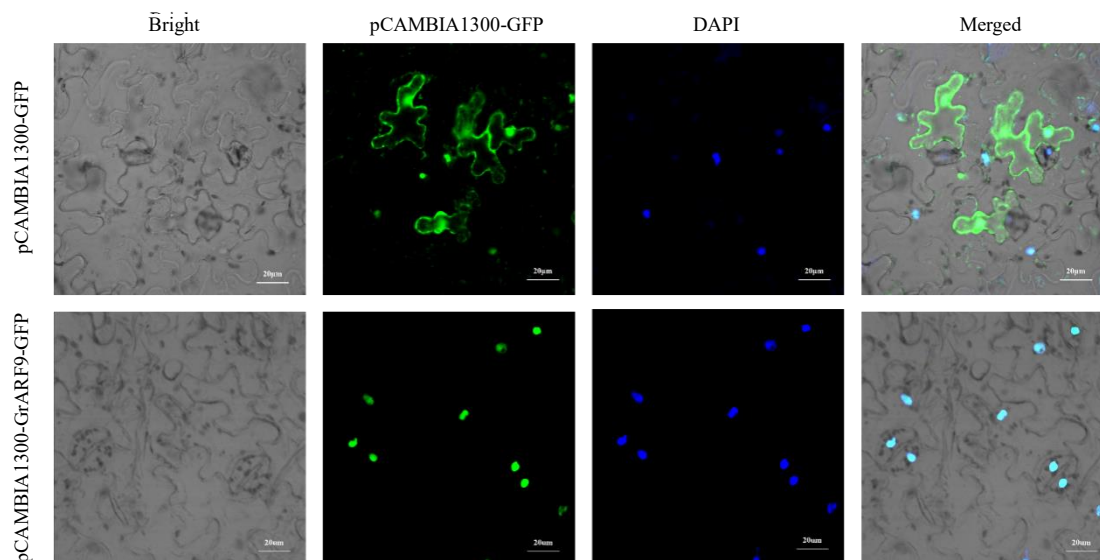


图 8 GrARF9 蛋白的亚细胞定位
Fig. 8 Subcellular localization of GrARF9 protein

低温闭合的现象^[21]。综合上述研究结果可见，花冠反复开闭是龙胆科植物中广泛存在的共性特征。而花朵的开放与闭合一般与细胞的可逆扩张有关：月季 *Rosa hybrida* E.H.L. Krause.开花是由于花瓣基部近远轴侧细胞的不对称生长驱动的^[22]；在番茄 *Solanum lycopersicum* L.花朵开放过程中，膨胀素通过酸诱导引发细胞膨胀扩张^[23]，前期课题组也证实滇龙胆花冠感温开闭运动与细胞扩张有关^[21]。

生长素作为与细胞伸长与扩张直接相关的激素，其核心作用机制是通过调控细胞壁的松弛度与细胞内的渗透压变化，激活细胞壁修饰相关基因的表达，为细胞体积增大提供必要条件。ARF 是生长素信号传导的核心响应因子，是一类具有特殊结构的转录因子，其基因结构主要包含 3 个关键结构域，即：位于 N 端的 B3 DNA-结合结构域、中间结构域 MR 和位于 C 末端的 CTD 结构域^[24]，这些结构域协同作用，赋予了 ARF 在生长素信号通路中独特的调控功能。本研究中鉴定出来的 21 条 *GrARFs* 基因大部分含有 3 个结构域：B3 DNA-结合结构域、Auxin-resp 和 AUX-IAA superfamily，有 3 个基因 *GrARF16*、*GrARF21*、*GrARF15* 无 AUX-IAA superfamily 结构域，暗示它可能在滇龙胆进化过程中基因片段发生了部分丢失，与茶树^[7]、颠茄^[8]一致。系统进化树分析显示，本研究中的 *GrARFs* 蛋白可被划分为 4 组，该分组结果与水稻 *Oryza sativa* L.^[25]、葡萄 *Vitis vinifera* L.^[26]和甜橙 *Citrus sinensis* L.^[27]等的研究结果一致。生物信息学分析显示滇龙

胆 ARF 蛋白的蛋白特性、氨基酸长度有较大差异，说明滇龙胆 ARF 家族蛋白的特性不一，可能具有多样化的生物学功能。滇龙胆花冠运动由温度精细调控，本研究表明，*GrARFs* 基因家族启动子区域含有大量与外界刺激响应相关的调控位点，且大部分 *GrARFs* 基因启动子区域含有温度响应元件。由染色体定位和共线性分析结果可知，*GrARFs* 在染色体上形成串联重复，且与拟南芥和月季有多条共线性，表明滇龙胆中的 *ARFs* 基因也可能通过调控细胞的扩张进而参与花冠的感温运动。

在滇龙胆花朵不同开闭状态下，*GrARFs* 基因的表达量具有明显差异，推测 *GrARFs* 在滇龙胆花冠感温运动中发挥功能。亚细胞定位预测结果显示，滇龙胆 ARF 蛋白主要定位在细胞核中，具有转录因子的定位特征。表达量差异较大的 *GrARF9* 蛋白进行亚细胞定位试验结果也显示，ARF9 蛋白定位于细胞核，这与其他物种 ARF 蛋白定位^[28-29]基本一致，说明 *ARF9* 基因可能在响应生长素的转录调控中发挥作用。

本研究通过对 *GrARFs* 基因家族的鉴定和分析，得到了滇龙胆 *ARFs* 家族基因信息，探究了 *GrARFs* 家族基因在滇龙胆感温运动中的表达模式，亚细胞定位试验验证了 *GrARF9* 蛋白定位在细胞核，为进一步研究 *GrARFs* 家族基因在滇龙胆花冠运动中的功能奠定了基础。然而，*GrARFs* 响应滇龙胆花冠感温运动的分子机制还有待进一步验证，以明确该家族基因在滇龙胆花冠感温运动中的具体功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志(第39卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 100.
- [2] de Vetten N C, Huber D J. Cell wall changes during the expansion and senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals [J]. *Physiol Plant*, 1990, 78(3): 447-454.
- [3] Yap Y M, Loh C S, Ong B L. Regulation of flower development in *Dendrobium crumenatum* by changes in carbohydrate contents, water status and cell wall metabolism [J]. *Sci Hortic*, 2008, 119(1): 59-66.
- [4] Jung J H, Domijan M, Klose C, et al. Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2016, 354(6314): 886-889.
- [5] Freire-Rios A, Tanaka K, Crespo I, et al. Architecture of DNA elements mediating *ARF* transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(39): 24557-24566.
- [6] Li S B, Xie Z Z, Hu C G, et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 47.
- [7] 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.
- [8] 周省委, 陈璐, 顾旭鹏, 等. 颠茄生长素应答因子 ARF 基因家族的全基因组鉴定及表达特征分析 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7419-7434.
- [9] 关思静, 高静, 徐蓉蓉, 等. 甘草生长素反应因子 (ARF) 基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(29): 20-27.
- [10] 江海洋, 魏巍, 刘艳, 等. 高粱生长素反应因子 (ARF) 基因的全基因组分析与进化研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(3): 395-400.
- [11] 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.
- [12] Liu R, Gao Y K, Guan C J, et al. The comparison of temporal transcriptome changes between morning-opening and afternoon-opening iris flowers reveals the candidate genes regulating flower opening and closing [J]. *J Plant Biol*, 2023, 66(5): 455-473.
- [13] Chen C X, Hussain N, Ma Y X, et al. The ARF2-MYB6 module mediates auxin-regulated petal expansion in rose [J]. *J Exp Bot*, 2023, 74(15): 4489-4502.
- [14] Ke M Y, Gao Z, Chen J Q, et al. Auxin controls circadian flower opening and closure in the waterlily [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 143.
- [15] van Doorn W G, Dole I, Çelikel F G, et al. Opening of iris flowers is regulated by endogenous auxins [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(2): 161-164.
- [16] 李珍. 甘蔗割手密种 *WRKY* 基因家族的全基因组鉴定及表达分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- [17] Claus G. Die blütenbewegungen der gentianaceen [J]. *Flora Oder Allg Bot Zeitung*, 1926, 120(3): 198-226.
- [18] Bynum M R, Smith W K. Floral movements in response to thunderstorms improve reproductive effort in the Alpine species *Gentiana algida* (Gentianaceae) [J]. *Am J Bot*, 2001, 88(6): 1088-1095.
- [19] Kozuharova E K, Anchev M E. Nastic corolla movements of nine *Gentiana* species (Gentianaceae), presented in the Bulgarian flora [J]. *Phytologia Balcanica*, 2006, 12(2): 255-265.
- [20] He Y P, Duan Y W, Liu J Q, et al. Floral closure in response to temperature and pollination in *Gentiana straminea* Maxim. (Gentianaceae), an Alpine perennial in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Plant Syst Evol*, 2005, 256(1): 17-33.
- [21] 陈丹. 滇龙胆花冠感温运动对高山繁育的适应策略及分子机理 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2023.
- [22] Cheng C X, Yu Q, Wang Y R, et al. Ethylene-regulated asymmetric growth of the petal base promotes flower opening in rose (*Rosa hybrida*) [J]. *Plant Cell*, 2021, 33(4): 1229-1251.
- [23] Brummell D A, Harpster M H, Dunsmuir P. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(1): 161-169.
- [24] 胡晓, 侯旭, 袁雪, 等. ARF 和 Aux/IAA 调控果实发育成熟机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 37-44.
- [25] Wang D K, Pei K M, Fu Y P, 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] 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 Rep*, 2014, 33(8): 1365-1375.
- [27] D'Hont A, Denoeud F, Aury J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. *Nature*, 2012, 488(7410): 213-217.
- [28] Hao Y W, Hu G J, Breitel D, et al. Auxin response factor SlARF2 is an essential component of the regulatory mechanism controlling fruit ripening in tomato [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(12): e1005649.
- [29] Shen C J, Wang S K, Bai Y H, et al. Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(14): 3971-3981.

[责任编辑 时圣明]