

# 小麦 ARF 基因家族生物信息学分析及在干旱胁迫下的表达特性研究

孙仁玮<sup>1,2,5</sup>, 刘永杰<sup>2,5</sup>, 王翔<sup>4,5</sup>, 张荃<sup>3</sup>, 张立平<sup>2,5</sup>, 孙辉<sup>2</sup>,  
王永波<sup>2</sup>, 高建刚<sup>2</sup>, 杨卫兵<sup>2</sup>, 赵昌平<sup>2,5</sup>, 高世庆<sup>2,5</sup>, 韩俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; <sup>2</sup>北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097;

<sup>3</sup>山东师范大学生命科学院, 济南 250014; <sup>4</sup>华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;

<sup>5</sup>杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京 100097)

**摘要:**植物生长素响应因子 ARF (auxin response factor) 参与调节了植物的向性运动、顶端优势、微观的分化、侧根和茎的形态发生等众多生理反应, 在植物生长发育的整个过程都起到重要调控作用。本研究通过对小麦最新基因组数据进行分析, 获得了 61 个 ARF 家族基因, 命名为 *TaARFs*, 根据染色体编号排列为 *TaARF1* ~ *TaARF61*, 对 61 个 *TaARFs* 基因进行系统生物信息学分析后发现 ARF 家族基因结构较为复杂, 外显子数量从 1 个到 15 个变化不等, 除了 4 号染色体和 5A 和 5B 染色体之外, 其余的染色体均有 ARF 家族基因分布。ARF 家族基因大多包含 B3 DNA 结构域、ARF 结构域 (Auxin-resp) 和 Aux/IAA 结构域; 同源进化分析表明, 小麦 ARF 家族基因的旁系同源基因数量明显多于大麦和二穗短柄草。通过拟南芥数据库比对获得 14 个高同源的根系发育相关的小麦 ARF 家族基因, 利用二系杂交小麦京麦 6 号及父母本根系为试材进行干旱胁迫处理及实时荧光定量 PCR (qPCR) 筛选。结果表明, 7 个小麦 ARF 基因不同程度受到干旱胁迫诱导, 其在干旱胁迫下的表达量显著高于正常条件下的表达量, 可能参与干旱胁迫应答; 此外本研究还发现, ARF 基因在 F<sub>1</sub> 杂交种中表达量显著高于双亲, 表现出超亲表达模式, 可能参与了根系抗旱杂种优势基因表达调控网络。

**关键词:**小麦; ARF 家族; 生物信息学; 根系发育; 干旱胁迫

## Bioinformatics Identification of Auxin Response Factor Genes and Expression Profiles under Drought Stress in Wheat

SUN Ren-wei<sup>1,2,5</sup>, LIU Yong-jie<sup>2,5</sup>, WANG Xiang<sup>4,5</sup>, ZHANG Quan<sup>3</sup>, ZHANG Li-ping<sup>2,5</sup>, SUN Hui<sup>2</sup>,  
WANG Yong-bo<sup>2</sup>, GAO Jian-gang<sup>2</sup>, YANG Wei-bing<sup>2</sup>, ZHAO Chang-ping<sup>2,5</sup>, GAO Shi-qing<sup>2,5</sup>, HAN Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206;

<sup>2</sup>Beijing Hybrid Wheat Engineering and Technology Research Center, Beijing 100097;

<sup>3</sup>Life Science of Shandong Normal University, Jinan 250014;

<sup>4</sup>College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

<sup>5</sup>Hybrid Wheat Molecular Genetics Key Laboratory, Beijing 100097)

**Abstract:** Auxin response factors (ARFs), which activate or repress the auxin response genes by binding to auxin response elements (AuxREs) on promoters, are essential to auxins signal transduction and act as critical roles in modulating various biological processes. In this study, *TaARF* genes were comprehensively identified from current wheat genome by using bioinformatics methods and gene structure, chromosome location prediction, conserved

收稿日期: 2017-07-06 修回日期: 2017-08-09 网络出版日期: 2017-09-11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170911.1637.002.html>

**基金项目:**国家自然科学基金(31571641); 北京市自然科学基金项目(6162009); 北京农林科学院储备项目(KJCX20170421); 国家自然科学基金-国际(地区)合作与交流项目(31661143018)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: srw0719@163.com

通信作者: 韩俊, 研究方向为小麦分子育种。E-mail: hanjun4226@163.com

高世庆, 研究方向为小麦分子育种。E-mail: gshiq@126.com

赵昌平, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: cp\_zhao@vip.sohu.com

domain of proteins, homologous evolution and homologous protein were analyzed. Results showed that 61 *TaARF* genes were identified, which were located on the chromosomes except chromosome 4A, 4B, 4D, 5A and 5B. The nomenclature was based on the positions of the wheat chromosomes. *TaARF* genes had complex structure. The number of exons varied from 1 to 15, most of *TaARF* genes contained conserved B3 domain, Auxin-resp domain and Aux/IAA domain. Analysis for homologous evolution showed that the number of paralogs of *TaARF* genes were more than *HvARF* genes and *BdARF* genes. Fourteen *TaARF* genes which were related to root development were gained by using sequence alignment to the *Arabidopsis* database. A wheat line JM6 was subjected to drought stress treatment followed qPCR analysis of the 14 genes. Seven genes showed more than 5 times over control in expression level. Compared with its parents,  $F_1$  hybrids had a higher expression level. Based on these results, we speculated that *TaARF* genes played an important role in response to drought stress. These might be involved in the heterosis and the gene expression regulation network of root drought tolerance.

**Key words:** wheat; ARF family; bioinformatics; root development; drought stress

生长素作为植物体中发现最早的激素,在植物生长发育整个过程中都起着重要调控作用<sup>[1]</sup>。生长素参与调节了植物众多的生理反应,如植物的向性运动、顶端优势、微观的分化、侧根和茎的形态发生等<sup>[2]</sup>。生长素分子水平的作用由生长素调控基因的表达来起始或介导<sup>[3]</sup>。生长素基因家族主要包括 AUX/IAA、SAUR 和 GH3 等 3 类,这些基因的启动子通常包括最小的生长素反应元件 TGTCTC 序列,目前的研究认为,这些生长素基因家族的很多成员参与到植物响应逆境胁迫反应中<sup>[4]</sup>。ARF (auxin response factor) 是一类调控生长素响应基因表达的转录因子<sup>[5]</sup>,能够特异地与生长素响应基因启动子区域的生长素响应元件 (AuxREs) TGTCTC 结合,激活或抑制基因的表达<sup>[3]</sup>; ARF 蛋白通常包含一个氨基端的 DNA 结合结构域 (DBD), 一个中间区域 (AD/RD), 作为激活结构域 (AD) 或抑制结构域 (RD) 和一个羧基末端的二聚作用结构域 (CTD)<sup>[5]</sup>。ARF 的激活结构域 (AD) 富含谷氨酰胺、丝氨酸和亮氨酸残基,而 ARF 的抑制结构域 (RD) 则富含丝氨酸、脯氨酸、亮氨酸和甘氨酸残基<sup>[6]</sup>。目前,约鉴定了 16 种植物的 ARF 基因家族,对其同源关系、结构、组织表达特性也进行了相关研究<sup>[7]</sup>。例如在水稻和玉米中,分别鉴定了 25 个和 36 个 ARF 家族基因<sup>[8-9]</sup>。除了常见的草本植物,毛茛、甜橙、香蕉等植物也有相关研究报道<sup>[10-12]</sup>。根是植物重要的器官,除了吸收水分和养分外,具有支持、繁殖、贮存合成有机物质的作用。ARF 基因与根系发育密切相关,而根系的发育与植物的抗旱性能更是密不可分。干旱会使生长素含量降低,使得植物的生长速度减慢,从而缓解因水分不足对植株完成正常生理活动造成的压力<sup>[4]</sup>。已有研究表

明,生长素在中柱鞘区域能够促进侧根的形成<sup>[13]</sup>,而在胚基部细胞中,生长素促进根的形成<sup>[14]</sup>。对拟南芥中干旱相关基因表达与植物激素关系的研究发现,641 个激素响应基因参与干旱反应,其中 95 个基因是干旱和生长素响应的重叠基因<sup>[15]</sup>。同时发现干旱胁迫信号可能受生长素负调控,也有编码生长素响应蛋白基因被干旱所诱导<sup>[16-17]</sup>。拟南芥中转录因子 MYB96,通过介导 ABA 参与生长素的信号路径,调节干旱条件下侧根分生组织活性,已有研究证明,MYB96 过表达突变体中 GH3 基因表达明显提高,而侧根形成减少,抗旱性增强<sup>[18-19]</sup>。拟南芥的 LBD/ASL 基因受到 AtARF7 与 AtARF19 的激活后,可以调控侧根的发育<sup>[20]</sup>。AtARF10 或 AtARF16 的单突变体没有表现出明显的表型<sup>[21]</sup>,而 ARF10 和 ARF16 双突变体表现出根冠发育及根向重力性的异常<sup>[22]</sup>。ARF7 或 ARF19 单突变,侧根数目稍微减少,当 ARF7 和 ARF19 同时突变,侧根数目严重减少<sup>[21-23]</sup>,说明 AtARF7 与 AtARF19 在拟南芥侧根发生过程中起重要作用,并且在功能上有一定的冗余<sup>[21]</sup>。当 ARF10 和 ARF16 双突变后,根冠出现发育缺陷及异常的根向重力性<sup>[21-22]</sup>。这些都证明了生长素及其响应因子与根系发育和抗旱性能关系紧密。小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是我国最重要的粮食作物之一,干旱、盐碱等非生物胁迫严重影响小麦的产量和品质。小麦的基因组十分复杂,由 A、B、D 三个亚基因组整合在一起而形成的异源六倍体 (AABBDD),其基因组大小约为 17 GB,重复序列高达 85%。近年来,在全球科研工作者的共同努力下,高质量的小麦基因组序列已完成拼装并释放 (<http://www.wheatgenome.org/>)<sup>[24]</sup>。此外,我国科学家在国际上率先完成了小麦 A 基因组供体乌拉

尔图小麦 (*Triticum urartu* Thum. ex Gandil) 和 D 基因组供体粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 的基因组测序工作<sup>[25-32]</sup>, 这为深入研究小麦基因组及其进化过程, 筛选优异抗逆基因资源奠定了基础。目前关于生长素响应 ARF 转录因子参与小麦根系抗旱杂种优势尚未见相关研究报道。因此, 本研究利用最新公布的小麦基因组数据, 通过生物信息学方法系统分析小麦 ARF 基因家族的基因序列、基因结构及同源进化关系, 同时对根系发育相关的小麦 ARF 基因进行干旱条件下表达特异筛选, 为小麦抗旱分子育种提供优良基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 小麦 ARF 基因家族的鉴定

从 ENSEMBL 数据库 (<http://plants.ensembl.org/>) 下载小麦的基因组序列、基因注释文件和蛋白质序列文件; 将基因组上散在的非染色体序列合并为 U 染色体, 将基因位点按照染色体顺序命名编号并映射到不同染色体上。Pfam 版本为 28.0, 小麦基因组和注释版本为 IWGSC1 + popseq. 31。同时下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyum* (L.) Beauv.) 和高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 基因组和蛋白序列数据。

利用 blastx<sup>[33]</sup> 将已报道的 ARF 基因核酸序列与 Pfam 数据库进行比对, E-value 阈值设为 1e-5。筛选得到 ARF 基因家族的 Pfam ID 及其对应序列。筛选得到的 Pfam ID 经过 EMBL-EBI 确认<sup>[34]</sup>, 利用 BLAST<sup>[35]</sup> 将各物种的蛋白质序列与本基因家族 Pfam 序列进行比对, 得到候选 ARF 基因家族。再用 pfam\_scan<sup>[36]</sup> 基于 Pfam 数据库的 HMM 文件进行比对, 得到每个物种最终基因序列和蛋白序列, 最后对这些基因按照染色体的顺序进行重新编号命名。

利用 NCBI 的 CD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 功能查找每个基因的保守域位置和 ORF 阅读框位置, 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 ARF 蛋白进行分子量、等电点、氨基酸信息预测。使用 DNAMAN 6.0 对 ARF 蛋白进行多序列比对, 获得 AD/RD 区域相关氨基酸含量的信息。

### 1.2 小麦 ARF 基因家族进化分析

利用 MUSCLE<sup>[37]</sup> 对序列进行多重比对 (multiple

sequence alignment), 然后通过 MEGA7<sup>[38]</sup> 用邻接法 (Neighbor-joining)<sup>[39]</sup> 构建系统发育树并进行 1000 次重复 bootstrap 检验<sup>[40]</sup>, 进化距离矩阵 (evolutionary distance matrix) 由 Poisson 模型生成。利用 Inparanoid<sup>[41]</sup> 分析两两物种间的同源蛋白 (OG, orthologous groups), 然后用 MultiParanoid<sup>[42]</sup> 基于上步结果分析多物种间的 OG, 再使用 circos<sup>[43]</sup> 基于基因注释信息对 OG 关系进行作图, 删除 OG 聚类过程中没有同源关系的基因使得同源基因在图片中显示。

### 1.3 小麦 ARF 基因家族序列及基因结构分析

利用 GSDS 在线工具 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 制作 ARF 家族基因外显子-内含子结构图, 使用 biopython<sup>[44]</sup> 基于基因注释信息 (外显子、CDS、UTR 等) 进行可视化, 并对 ARF 家族基因结构进行解释。

### 1.4 根系发育相关 ARF 基因干旱胁迫表达模式分析

**1.4.1 根系发育相关 ARF 基因的获得** 为了进一步了解 ARF 家族基因在根系干旱胁迫处理下的表达特性, 根据拟南芥已有功能注释, 首先对 61 个 *TaARF* 基因与拟南芥基因数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 进行同源性比对, 取 E-value 值最小的序列, 获得 14 个与根系发育相关的 *TaARF* 基因 (表 1)。

表 1 根系发育相关的 *TaARF* 基因

Table 1 *TaARF* genes associated with root development

基因名称 Gene name	拟南芥 ARF 基因 <i>AtARF</i>	E-value 值 E-value	拟南芥 ARF 基 因功能注释 <i>AtARF</i> gene function annotation
<i>TaARF1</i>	<i>AtARF10</i>	7e-06	根冠的发育
<i>TaARF25</i>		3e-07	
<i>TaARF17</i>		7e-06	
<i>TaARF22</i>	<i>AtARF16</i>	2e-06	根冠的发育
<i>TaARF60</i>		2e-06	
<i>TaARF56</i>		1e-04	
<i>TaARF6</i>	<i>AtARF17</i>	2e-05	不定根的发育
<i>TaARF30</i>	<i>AtARF7</i>	1e-06	侧根的形成和发育
<i>TaARF9</i>		4e-09	
<i>TaARF43</i>		1e-07	
<i>TaARF11</i>		1e-08	
<i>TaARF12</i>		3e-12	
<i>TaARF16</i>		1e-10	
<i>TaARF51</i>	<i>AtARF19</i>	4e-18	侧根的发育

**1.4.2 材料处理与实时荧光定量实验** 京麦 6 号小麦品种由北京杂交小麦工程技术研究中心选育, 2005 年通过北京市小麦品种审定, 具有较强的抗病、抗寒、抗旱性和耐渍性。本研究选取大小一致、饱满无损伤的小麦种子, 且均由北京杂交小麦工程技术研究中心提供。75% 酒精灭菌后, 在 20℃、光周期 12 h/12 h 的条件下水培 2 周, 取完整新鲜的小麦植株, 用滤纸吸水, 置于干燥的滤纸上分别干旱处理 0 h、1 h、3 h、6 h, 取完整的幼根约 100 mg 立即液氮速冻, -80℃ 保存备用。

采用 Trizol 试剂 (Ambion, USA) 按照说明书步骤从处理的幼根中提取总 RNA, 检验 RNA 合格后按照 Takara 反转录试剂盒 PrimerScript™ RT reagent Kit (with gDNA Eraser) 说明书进行反转录。采

用 Takara 实时荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex 和实时荧光定量 PCR 仪 (BioPad) 进行实时荧光检测。采用 18S 为内参基因。设计 14 个基因的实时荧光定量引物 (表 2), 引物采用 Primer Premier 5.0 设计, 由上海生工公司合成。

利用在线工具 NCBI CDD 查找基因的保守域, 为避免非特异扩增, 在保守域以外区域设计引物 (表 2)。实时荧光定量试验前, 先利用引物在 cDNA 模板中进行扩增筛选特异引物。实时荧光定量 PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 10 min, 1 个循环, 95℃ 变性 10 s, 57℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 反应体系为 20 μL。基因拷贝数采用 CT 值法进行计算, 目的基因表达量的统计方法采用相对定量法 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )<sup>[45]</sup>。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences of real-time quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
TaARF1-F	GCACGGAGGCTGACGATAATA	TaARF22-R	ACATCCTCCGATTCCATAAATA
TaARF1-R	GCACGGGTAAACAAACGCTAAT	TaARF25-F	GTTCAAGTTCGCCACATCTAC
TaARF6-F	AGATTGCGAAAACATGCTGAT	TaARF25-R	GTTACGAAAGTTGCTCCAGC
TaARF6-R	CTGGAGCTAGGTGGGAAGAAC	TaARF30-F	CCAACACCAGCCCATTTCACC
TaARF9-F	CAACACCAGCCCATTTCACC	TaARF30-R	TTCCTCCGTCTCGCACATC
TaARF9-R	CCAGTTATCGTACCCATGTACC	TaARF43-F	GGGACGATAACAGAAGTGAGTG
TaARF11-F	AGGCATACGGCGTGCTA	TaARF43-R	GATGCTTAACCCCTCAGCGGA
TaARF11-R	ATTCTGATGGGCTCGCCCTAT	TaARF51-F	GCGAAGCAGGGGAGAAGAA
TaARF12-F	GGAGATATTGCTGGCATCAGAG	TaARF51-R	CTGTGGAAGTAGACGACGAGG
TaARF12-R	AATGAGAAGTCAAGACGAGGGA	TaARF56-F	TTCCGAGACCGAGGATTTCGTC
TaARF16-F	GGTACAATAACTGGCATAAGTGATC	TaARF56-R	CCGCTTCACATTCTGGAGGA
TaARF16-R	GTGTGGGATAGATGAAGAAAGGAG	TaARF60-F	ACACCACAGAGCACAGAAAAAT
TaARF17-F	GACGTGCTCTACTACCCGAGGG	TaARF60-R	GGTGAAGTATTTCCAGTAGCCC
TaARF17-R	GGACGAGTCTCTCGTCTCGA	18S-S	TGCTGGAATCGGAATAGTTGAG
TaARF22-F	AACACTCTCTCTGGGGCTAC	18S-A	ACTACGCAGGCTCATCAAACAG

2 结果与分析

2.1 小麦 ARF 基因家族鉴定及蛋白特性分析

经过 EMBL-EBI 确认, 生长素响应因子的 Pfam 号为 PF06507, 通过 HMM 程序搜索得到小麦 ARF 基因家族, 去除冗余, 最终获得了 61 个成员, 按照其染色体顺序分别命名为 *TaARF1* ~ *TaARF61* (表 3)。对 61 个 *TaARF* 基因综合分析发现, 不同 ARF 蛋白的氨基酸含量差别很大, 分子量也存在较大差异, 变化范围为 7.91 kD (*TaARF36*) 到 126.08 kD (*TaARF9*)。ARF 蛋白的等电点大多小于 7, 推测其

编码弱酸性的蛋白, 在酸性的亚细胞环境中发挥作用, 这与赵艳等<sup>[46]</sup>研究结果一致。最长开放阅读框 (ORF) 变化范围为 150 bp (*TaARF44*) 到 3657 bp (*TaARF10*), 长度变化非常显著, 表示其基因结构的复杂性。ARF 蛋白通常由 BD、AD/RD 和 CTD 三部分组成, 中间区域的 AD/RD 决定着其激活或者抑制作用。植物原生质体转染实验表明, 拟南芥中 AtARF1、AtARF2、AtARF3、AtARF4 和 AtARF9 蛋白中间区域分别富含色氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和脯氨酸 (P), 通常发挥转录抑制作用; 而 AtARF5、AtARF6、AtARF7、AtARF8 和 AtARF19 中



间区域富含谷氨酸(G),通常发挥转录激活作用<sup>[47-50]</sup>。通过 DNAMAN 进行小麦 ARF 蛋白的多序列比对发现,TaARF17、TaARF33 和 TaARF51 中间区域富含谷氨酸(G),为 AD 激活结构域,推测

其主要发挥转录激活作用;TaARF34、TaARF55 和 TaARF57 中间区域富含色氨酸(S)、苏氨酸(T)和脯氨酸(P),为 BD 抑制结构域,主要发挥转录抑制作用。

表 3 61 个小麦 ARF 家族基因的基本信息

Table 3 Basic information of 61 wheat ARF family genes

基因名 Gene name	转录名 Genomic accession No.	染色体 定位 Chromosome location	保守域 位置 (bp) Location	外显子数 No. of exon	ORF 长度 (bp) Open reading fragment length	蛋白质预测 Protein prediction		
						氨基酸(aa) Amino acid	分子量(kD) Molecular mass	等电点 Isoelectric point
TaARF1	Traes_1AL_147CF243C.1	1AL	322 ~ 573	3	1380	459	49.68	6.73
TaARF2	Traes_1AL_B14FE48AF.1	1AL	535 ~ 780	8	378	615	67.08	8.18
TaARF3	Traes_1AL_B9A38E127.1	1AL	116 ~ 358	6	1269	422	46.80	8.86
TaARF4	Traes_2AL_05ECC440C.2	2AL	1108 ~ 1326	14	3192	977	107.83	6.05
TaARF5	Traes_2AL_A7941CB12.2	2AL	799 ~ 1035	14	2229	742	83.13	6.56
TaARF6	Traes_2AL_C70217249.1	2AL	721 ~ 948	2	1548	515	55.85	5.92
TaARF7	Traes_3AL_561A00448.1	3AL	453 ~ 695	9	1614	537	59.65	8.48
TaARF8	Traes_3AL_A30A3C355.1	3AL	598 ~ 840	6	792	263	29.99	10.26
TaARF9	Traes_6AS_967D58FB4.1	6AS	1228 ~ 1455	14	3408	1135	126.08	6.32
TaARF10	Traes_6AS_10D92215D.2	6AS	1666 ~ 1902	14	3657	928	102.39	5.93
TaARF11	Traes_7AS_1C1077D77.1	7AS	316 ~ 513	6	2310	845	—	—
TaARF12	Traes_7AS_582E3076D.1	7AS	652 ~ 807	8	786	262	29.35	9.70
TaARF13	Traes_7AL_F36D340F4.1	7AL	793 ~ 1026	15	3372	1123	125.23	6.59
TaARF14	Traes_7AL_1415D04BF.1	7AL	517 ~ 753	10	2190	729	80.83	7.18
TaARF15	Traes_3AL_E34DF2F08.1	3AL	586 ~ 831	7	1191	397	45.28	9.72
TaARF16	Traes_7AS_BABC015C7.1	7AS	34 ~ 111	—	1701	567	63.09	6.00
TaARF17	Traes_7AL_E3ADC8C38.1	7AL	3 ~ 239	3	912	227	—	—
TaARF18	Traes_3AL_5935773EA.1	3AL	3 ~ 176	—	1614	537	60.17	5.38
TaARF19	Traes_2AL_89543BA1A.1	2AL	760 ~ 1017	14	1965	654	72.52	6.14
TaARF20	Traes_3AS_9594B1341.2	3AS	984 ~ 1229	14	1656	551	60.39	7.56
TaARF21	Traes_5AS_A86138871.1	5AS	852 ~ 1085	14	2676	891	98.35	6.21
TaARF22	Traes_1BL_54CD82AC3.1	1BL	264 ~ 515	3	1380	459	49.77	6.76
TaARF23	Traes_1BL_A9AC1340E.2	1BL	310 ~ 555	8	369	231	25.80	9.07
TaARF24	Traes_1BL_408EABE70.1	1BL	70 ~ 291	—	1158	385	42.26	7.66
TaARF25	Traes_2BL_A1A475B0F.1	2BL	771 ~ 1022	1	1116	357	39.01	8.68
TaARF26	Traes_2BL_E322FD546.3	2BL	1302 ~ 1520	14	2868	955	105.35	6.17
TaARF27	TRAES3BF111600210CFD_t1	3B	757 ~ 1002	15	2376	792	88.57	5.97
TaARF28	Traes_3B_60D375C4E.1	3B	907 ~ 1152	14	2277	758	83.51	6.56
TaARF29	Traes_3B_615705174.1	3B	754 ~ 999	14	2391	796	89.10	6.48
TaARF30	Traes_6BS_444DFA94E.2	6BS	66 ~ 890	13	3213	1070	119.61	6.38
TaARF31	Traes_7BS_3FD792335.1	7BS	781 ~ 1011	12	3033	1010	112.92	6.54
TaARF32	Traes_7BS_F44A273F8.2	7BS	679 ~ 912	13	3117	1038	115.88	6.60
TaARF33	Traes_7BL_B680A7DE0.1	7BL	710 ~ 943	10	1479	493	55.98	8.64
TaARF34	Traes_7BL_66296695F.1	7BL	1686 ~ 1922	11	2052	684	75.82	6.86
TaARF35	Traes_2BL_BF6CE2765.1	2BL	15 ~ 152	3	252	84	10.02	6.57
TaARF36	Traes_2BL_6C8D4FFBA.1	2BL	1209 ~ 1352	3	213	71	7.91	9.62

表 3(续)

基因名 Gene name	转录名 Genomic accession No.	染色体	保守域	外显子数 No. of exon	ORF 长度	蛋白质预测 Protein prediction		
		定位 Chromosome location	位置 (bp) Location		(bp) Open reading fragment length	氨基酸(aa) Amino acid	分子量(kD) Molecular mass	等电点 Isoelectric point
<i>TaARF37</i>	Traes_6BS_BD894AD26.1	6BS	979 ~ 1215	14	2781	926	102.54	5.92
<i>TaARF38</i>	Traes_2BL_1AED96909.1	2BL	1248 ~ 1505	14	1965	654	72.58	6.02
<i>TaARF39</i>	Traes_5BS_3F6023CD6.1	5BS	1228 ~ 1461	14	2676	891	98.34	6.15
<i>TaARF40</i>	Traes_1DL_AF4C1F109.1	1DL	2 ~ 244	6	1269	422	46.86	8.87
<i>TaARF41</i>	Traes_2DL_A86E54838.2	2DL	938 ~ 1195	13	1821	606	67.38	5.67
<i>TaARF42</i>	Traes_2DL_FBE64209C.1	2DL	1241 ~ 1459	14	2868	955	105.37	6.19
<i>TaARF43</i>	Traes_2DL_8434C0251.2	2DL	766 ~ 1002	14	2226	741	82.92	6.42
<i>TaARF44</i>	Traes_3DL_5C378695E.1	3DL	292 ~ 534	5	150	178	20.37	10.56
<i>TaARF45</i>	Traes_3DL_734F1498E.1	3DL	885 ~ 1127	8	1515	504	55.88	10.19
<i>TaARF46</i>	Traes_3DL_BC7A7E056.1	3DL	301 ~ 546	8	831	277	31.52	10.48
<i>TaARF47</i>	Traes_3DL_1FC3735D9.1	3DL	327 ~ 572	10	1992	663	74.67	6.93
<i>TaARF48</i>	Traes_5DS_A71D29AE1.1	5DS	1334 ~ 1567	14	2679	892	98.37	6.11
<i>TaARF49</i>	Traes_6DS_8BE5BE6AC.1	6DS	1313 ~ 1540	14	3390	1129	125.32	6.32
<i>TaARF50</i>	Traes_6DS_F95C12EBB.1	6DS	1468 ~ 1704	14	2784	927	102.50	5.87
<i>TaARF51</i>	Traes_7DS_7375BED72.3	7DS	754 ~ 984	13	3093	1030	114.84	6.45
<i>TaARF52</i>	Traes_7DS_1948388F8.2	7DS	949 ~ 1182	13	3201	1066	118.78	6.48
<i>TaARF53</i>	Traes_7DL_343A252DC.1	7DL	808 ~ 1041	15	3387	1128	125.97	6.54
<i>TaARF54</i>	Traes_7DL_55ADB3528.1	7DL	298 ~ 549	3	1458	485	52.43	8.46
<i>TaARF55</i>	Traes_7DL_C89614A4D.1	7DL	1173 ~ 1409	14	2454	817	90.49	6.44
<i>TaARF56</i>	Traes_6DL_52A25BEA4.1	6DL	355 ~ 606	2	372	222	24.77	10.69
<i>TaARF57</i>	Traes_3DS_DCF1875CA.1	3DS	2 ~ 160	4	462	154	17.09	4.76
<i>TaARF58</i>	Traes_3DS_C47A53236.1	3DS	—	—	327	156	17.91	4.93
<i>TaARF59</i>	Traes_1DL_92BCA55C0.2	1DL	1063 ~ 1308	8	1218	406	45.62	8.74
<i>TaARF60</i>	Traes_1DL_AEC2F3FB3.1	1DL	263 ~ 514	3	1380	459	49.65	6.73
<i>TaARF61</i>	TRAES3BF097400050CFD_t1	3B	781 ~ 1023	10	2097	698	77.15	6.30

—表示未明确或无法预测该基因的该类信息

—indicates the information of the gene is not clear or can not be predicted

2.2 小麦 ARF 基因家族同源进化分析

为了分析小麦 ARF 家族基因与祖先材料及其他物种间的进化关系,采用生物信息学方法将 ARF 家族基因定位到不同染色体上(图 1),从染色体分布来看,除了 4A、4B、4D、5A 和 5B 染色体之外,其余的染色体均有分布,其中 6B、5D 上只含有 1 个,7D 上含有 5 个。根据目前已报道的小麦基因组数据,散在的序列在 TaUA、TaUB、TaUD 均有分布,包括 *TaARF16*、*TaARF51* 等 7 个基因(TaUA);*TaARF36*、*TaARF37* 等 5 个基因(TaUB);*TaARF56*、*TaARF57* 等 5 个基因(TaUD)。分散在基因组上的非染色体序列只有 *TaARF61* 基因,具有同源关系的基因进行了相关的连线说明。从同源关系来看,*TaARF15*、*TaARF17* 和 *TaARF33* 等 8 个基因与其他染色体上的基因没有同

源对应关系,而 *TaARF30* 和 *TaARF34* 等基因与祖先材料多个 ARF 基因具有同源关系。

将小麦分别与拟南芥、水稻、大麦、高粱和二穗短柄草之间构建同源关系,表 4 注释了小麦等 6 个物种间具有同源关系的基因数量。为了进一步探究小麦与其他 5 个物种的进化关系,利用 In-paranoid 4.1 软件计算两两物种间的同源进化关系(表 5)。基于它们之间直系同源基因的数目,可以估算出它们的直系同源进化关系。小麦种内旁系同源基因的平均数目为 2.13,这表明相对于其他 5 个物种的 ARF 基因家族,每个 *TaARF* 基因有 1.13 个旁系同源基因。与小麦相比,其他 5 个物种旁系同源基因数目均低于小麦,表明其旁系同源基因数量较少。

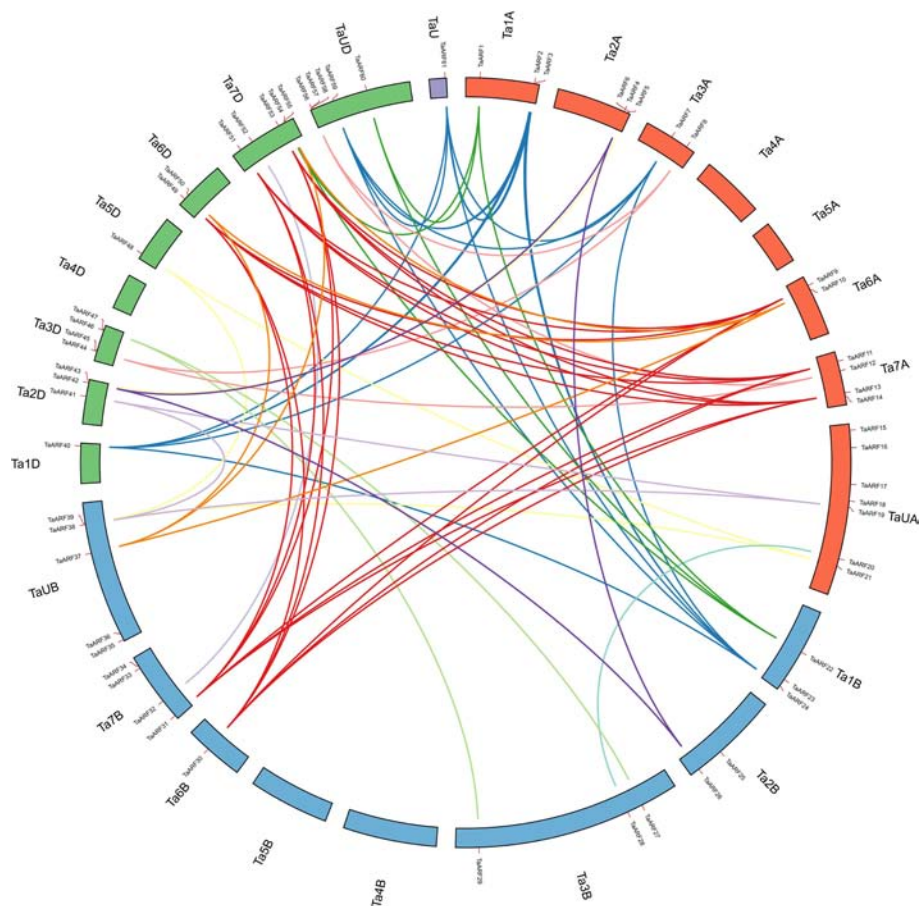


图 1 小麦 ARF 家族基因的染色体分布及同源关系

Fig. 1 Chromosome distributions and homology of the *TaARF* genes

表 4 各物种同源关系基因数量

Table 4 Number of cognate genes in different plant species

物种 Species	小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	高粱 <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyum</i> (L.) Beauv.	大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	基因数量 Number of genes
小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	—	27/17	31/17	37/19	36/20	31/27	61
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	17/27	—	16/16	14/16	16/21	20/29	35
水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	17/31	16/16	—	22/20	20/23	17/23	29
高粱 <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	19/37	16/14	20/22	—	23/29	16/27	29
二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyum</i> (L.) Beauv.	20/36	21/16	23/20	29/23	—	21/25	33
大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	27/31	29/20	23/17	27/16	25/21	—	51

表中数值表示纵列物种与横列物种同源基因的数量对应关系

The numerical numbers represent the number of homologous genes of longitudinal species and transverse species

表 5 各物种间直系同源鉴定的基因数量

Table 5 Total number of orthologs identified by In-paranoid 4.1

物种 Species	小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	高粱 <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyum</i> (L.) Beauv.	大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	直系同源组平均值 Average size of ortholog groups (number of in-paralogs)
小麦	—	27/9	31/15	37/19	36/18	31/19	2.13
拟南芥	17/9	—	16/8	14/7	16/8	20/8	2.08
水稻	17/15	16/8	—	22/19	20/18	17/14	1.32
高粱	19/19	16/7	20/19	—	23/21	16/14	1.32
二穗短柄草	20/18	21/8	23/18	29/21	—	21/15	1.56
大麦	27/19	29/8	23/14	27/14	25/15	—	2.06

纵向物种为 A,横向物种为 B,表中数值表示物种 A 相对于物种 B 中直系同源组的数量

The longitudinal species is A and the lateral species is B. The numbers indicate the number of ortholog groups in the species A to B

2.3 小麦 ARF 基因家族蛋白进化树及基因结构分析  
蛋白系统进化树显示,小麦 54 个 ARF 蛋白与

拟南芥、水稻等物种建立了系统进化关系,主要分为  
3 大类,而第 3 大类又分为 6 个亚类(图 2)。

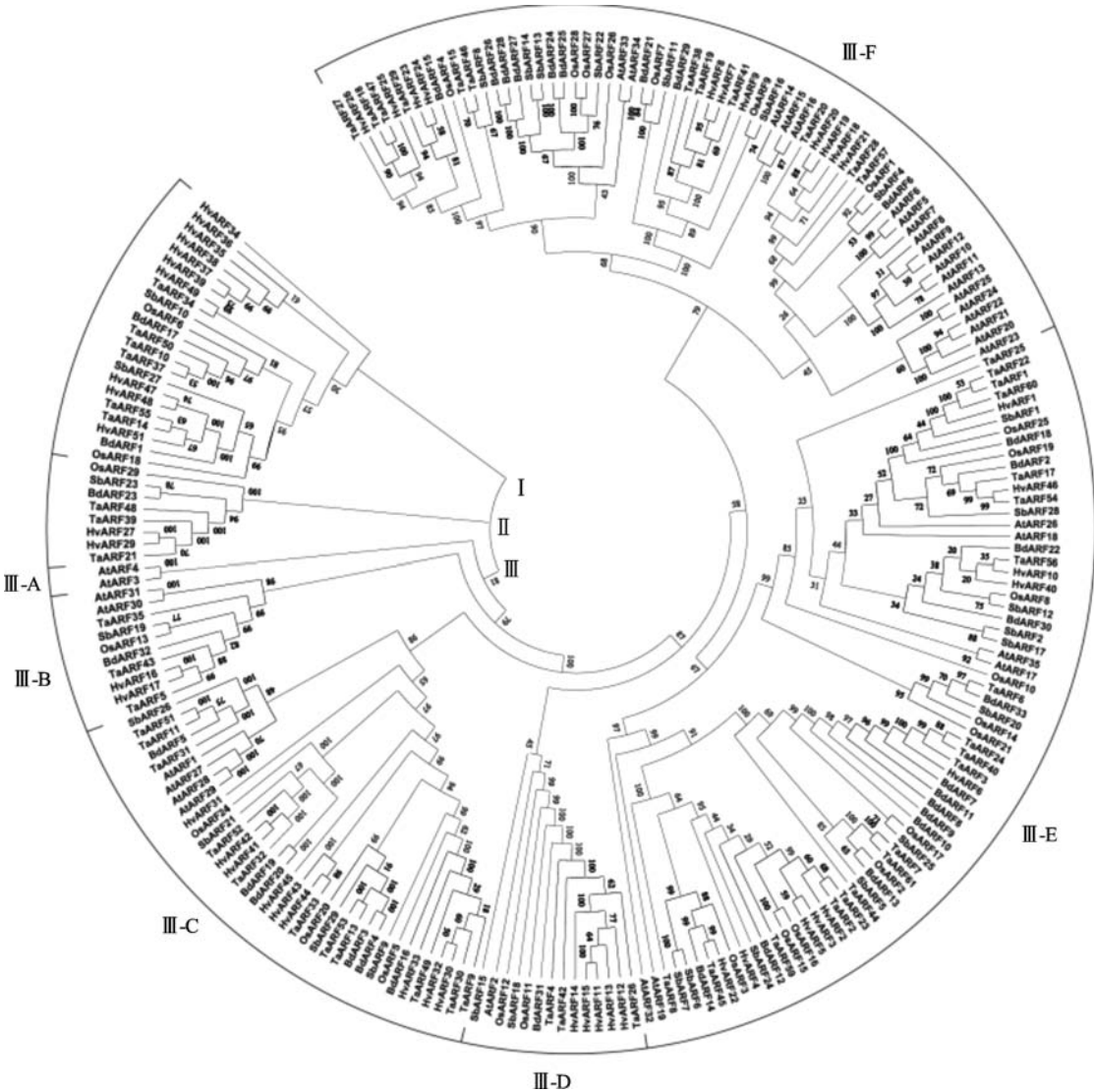


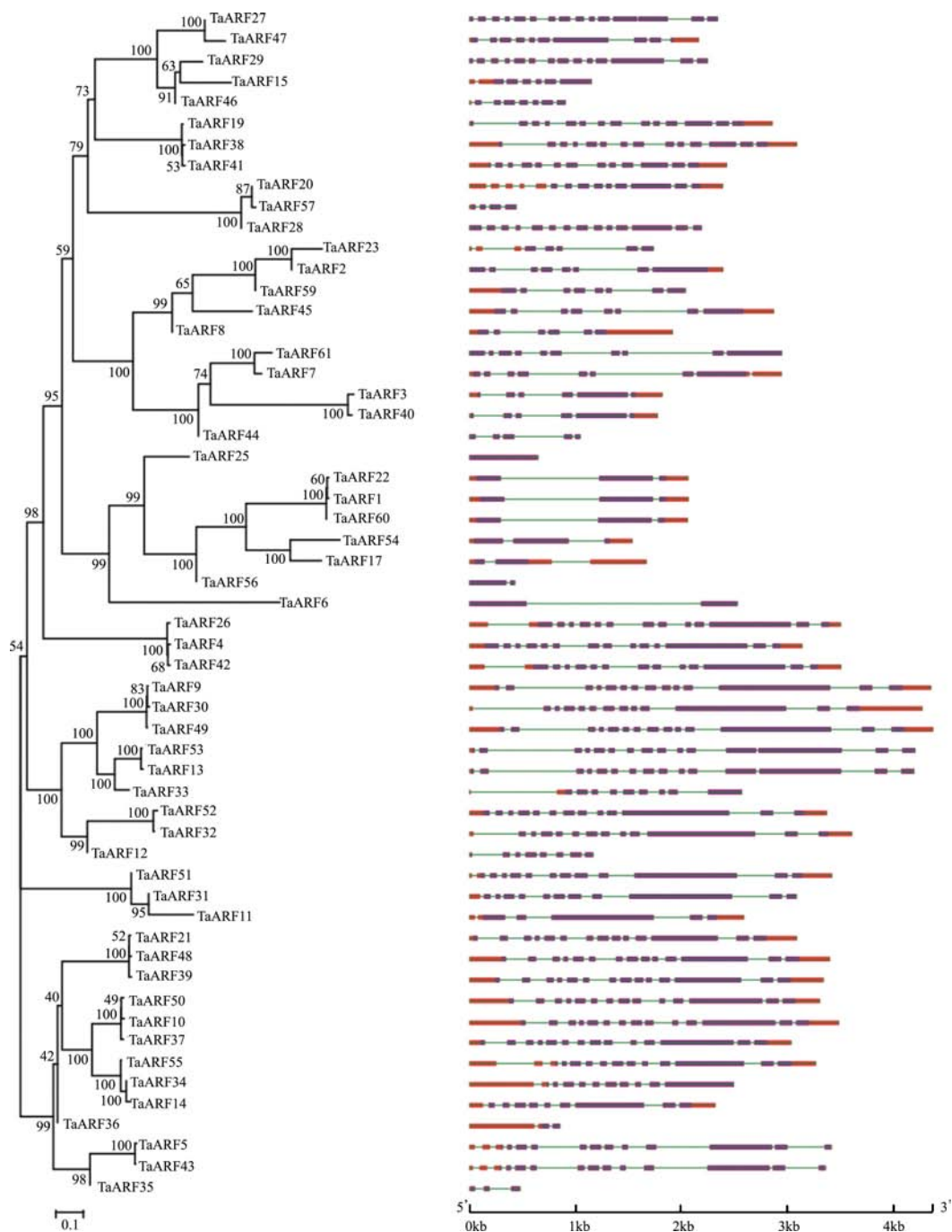
图 2 小麦与其他物种的 ARF 蛋白构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree built by the ARF proteins of wheat and other species



*TaARF* 基因外显子数量从 1 个 (*TaARF25*) 到 15 个 (*TaARF53*, *TaARF13*) 不等, 同一类之间的结构较为相似。总体来看, ARF 基因家族具有数量较多的内含子、外显子, 多数基因超过 5 个外显子, 其基因结构较为复杂多样。*TaARF25* 不含内含子, *TaARF6*、*TaARF56* 只含有 1 个内含子, 这些基因可

能产生或分化的时间较晚, 推测其功能相对专一。*TaARF13*、*TaARF27* 和 *TaARF53* 含有 15 个外显子, 具有极其相似的外显子和内含子结构, 蛋白进化树也具有极高的同源性, 表明亲缘关系近的 *TaARF* 基因在进化过程中其外显子、内含子具有一定的相似性(图 3)。



紫色粗框表示外显子, 绿线表示内含子, 前后加粗红色部分为该基因的 UTR 结构, 剔除了 4 个比对关系低的基因

The purple rough box represented exons and the green lines indicated the introns. The bold red part is the UTR structure of the genes, which excludes the four genes that with low relationship

图 3 *TaARF* 蛋白的系统发育树和 *TaARF* 基因结构图

Fig. 3 Phylogenetic tree of the *TaARF* proteins and gene structure of the *TaARF* genes

## 2.4 干旱胁迫下根系发育相关 ARF 基因的表达分析

根系的发育受到生长素的调控。为了鉴定京麦 6 号和其父母本的抗旱性,本研究对其进行了干旱胁迫的鉴定试验:选取生长 15 d,生长良好的京麦 6 号(JM6)、父本 GLDS 和母本 BS366 的幼苗各 30 株,15% 的 PEG 模拟干旱胁迫处理 20 d,重复 3 次。结果显示,京麦 6 号出现了明显优于父母本的抗旱性状,其存活率也明显高于父母本(图 4、图 5)。

为了了解干旱胁迫条件下 ARF 基因的表达情况,本研究对 14 个根系发育相关的 ARF 基因进行了实时荧光定量试验。结果表明,14 个基因呈现明显不同的表达趋势,*TaARF1*、*TaARF9*、*TaARF11* 等 7 个基因的最高表达量超过对照的 5 倍,*TaARF1*、*TaARF6*、*TaARF9* 和 *TaARF25* 基因在干旱处理 1 h 后呈现显著升高的表达趋势,其中 *TaARF9* 呈现最显著的升高,其干旱处理 1 h 的表达量是对照的 10.5 倍,这些基因有可能在受到干旱胁迫早期通过调控生长素来应对干旱逆境。*TaARF30* 和 *TaARF43* 在干旱处理 3 h 以后达到最高;而 *TaARF12*、*TaARF16*、*TaARF17* 等 7 个基因受干旱胁迫处理的最大表达量低于对照 5 倍(图 6)。

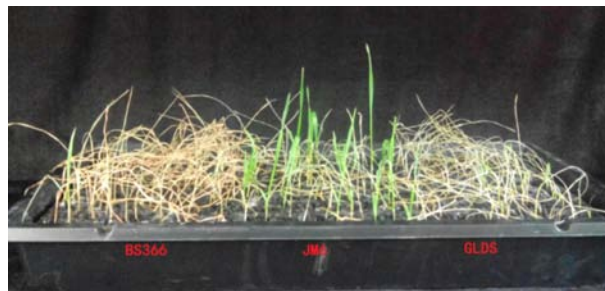


图 4 京麦 6 号及其亲本干旱胁迫试验

Fig. 4 The phenotype of JM6 and its parents under drought stress experiment

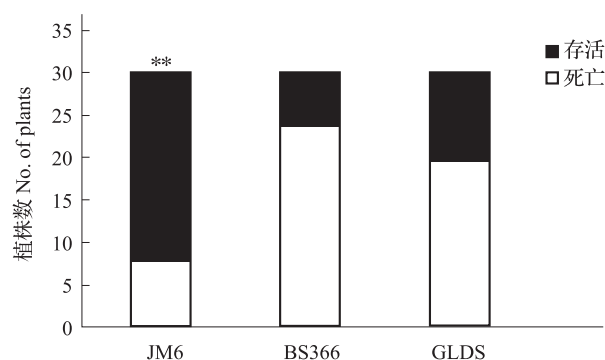
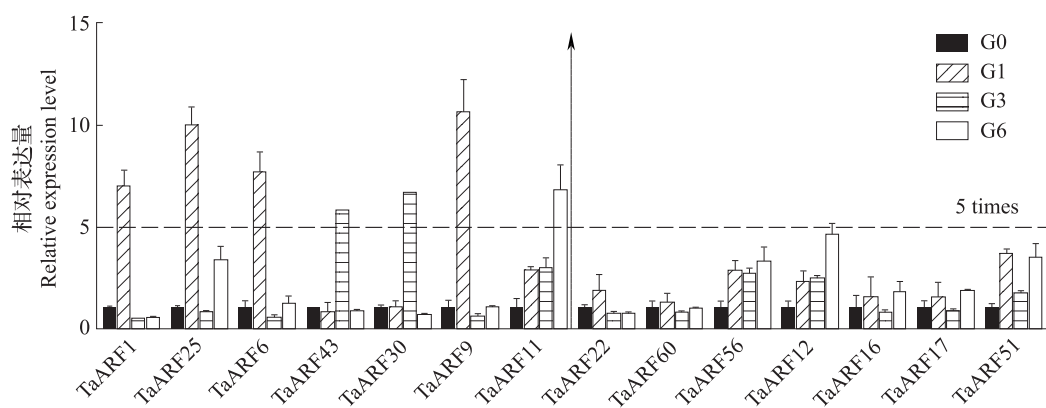


图 5 京麦 6 号及其亲本干旱胁迫试验存活率统计

Fig. 5 Survival statistics of JM6 and its parents under drought stress



G0、G1、G3、G6 分别表示对照及干旱处理 0 h、1 h、3 h、6 h,下同

G0, G1, G3 and G6 indicate the control and drought treatment of 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, respectively, the same as below

图 6 根系发育相关的 ARF 基因在干旱处理条件下的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of the ARF genes associated with root development in drought stress

## 2.5 干旱胁迫下小麦 ARF 基因在 JM6 杂交组合中的表达模式分析

为了进一步了解干旱胁迫条件下,小麦 ARF 基因在恢复系 GLDS、不育系 BS366 及 JM6 (GLDS × BS366) 杂交种中的表达模式,对 5 倍以上差异表达

的 7 个基因进行了实时荧光定量 PCR 试验,结果如图 7 所示,其中 *TaARF1*、*TaARF6*、*TaARF9* 和 *TaARF25* 干旱处理 1 h 时在 F<sub>1</sub> 的相对表达量明显高于父、母本,具有明显的超亲表达,推测其可能参与杂种优势相关的抗干旱胁迫功能;

*TaARF11*、*TaARF30* 和 *TaARF43* 分别在干旱处理 3 h 或 6 h 后出现了超亲的表达,而其他的处理时间段基本处于低亲或者中亲表达,可能其对生长素原初基因的调控有一定的滞后性。*TaARF30* 和 *TaARF43* 在干旱胁迫处理下出现低亲表达,其

亲本的相对表达量随着干旱处理时间的推移呈现逐步降低的趋势,推测干旱抑制了该类基因的表达。总之,*TaARF* 基因在 GLDS × BS366 杂交组合干旱胁迫的条件下呈现出复杂多样的表达模式。

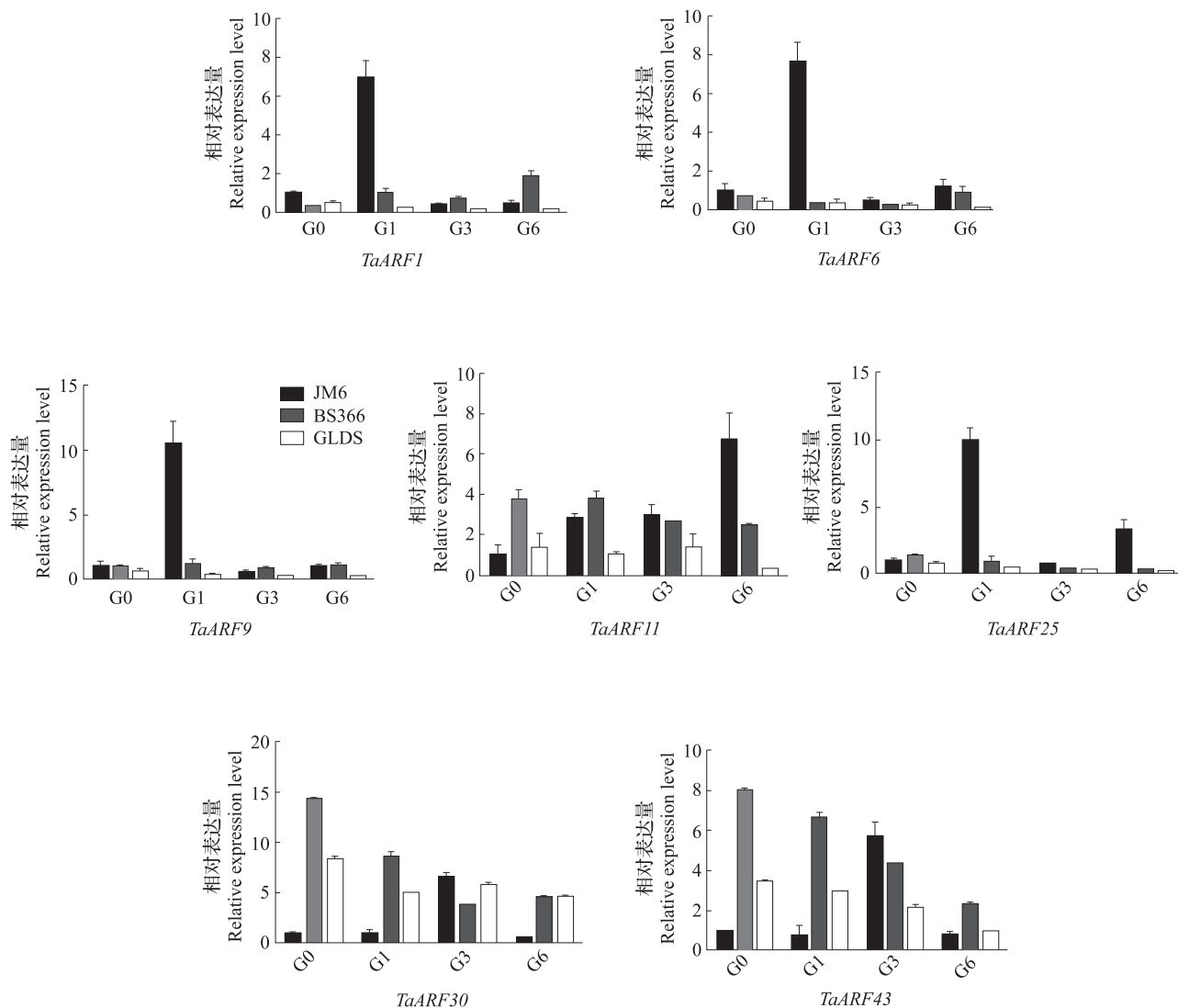


图7 显著差异表达基因在 JM6 杂交组合中的表达特性分析

Fig. 7 Expression analysis of significant differentially expressed genes in JM6 hybrids

### 3 讨论

作为最广泛的植物激素,生长素几乎参与了植物生长发育的各个阶段。*ARF* 基因广泛地参与调控了生长素初级响应基因的表达。目前,随着不同植物基因组测序的完成,其 *ARF* 基因的鉴定也有了不同程度的进展。除了玉米、水稻、谷子等粮食作物,烟草、番茄、木瓜等草本植物 *ARF* 家族基因也被鉴定出来。人们对植物中 *ARF* 的表达及参与相关

植物生长发育过程已经开展了很多研究,对 *ARF* 基因参与下游靶基因调控机制的研究也取得了一定进展<sup>[6]</sup>。生长素与植物根系发育密切相关,生长素及其响应因子在逆境胁迫中的作用一直是研究的盲点,有关干旱胁迫条件下生长素的作用机理及各种激素的消长与平衡之间的复杂关系还需要深入探讨<sup>[4]</sup>。本研究根据小麦已有的染色体数据,首次对六倍体小麦(*Triticum aestivum* L.)进行了 *ARF* 基因家族的研究,并在获得的 61 个 *TaARF* 基因的基础

上,利用实时荧光定量 PCR 技术对小麦根系发育相关的 *TaARF* 基因进行了干旱胁迫条件下的表达趋势的探讨,由于 *ARF* 基因的表达与很多下游基因以及 microRNA 紧密联系,具有复杂的调控网络,其调控机制需要更深入探讨。另外,在研究中还发现,GLDS × BS366 杂种 F<sub>1</sub> 中 *TaARF* 基因在干旱胁迫条件下呈现复杂多样的表达模式,表明杂种优势是基因多重行为模式与多种因素共同作用的结果<sup>[51-52]</sup>。

综上所述,本研究通过生物信息学的方法对普通小麦 *ARF* 基因家族进行分析,预测基因的结构与功能,并与其亲缘物种进行了相关的同源进化关系分析,实时荧光定量 PCR 表明干旱胁迫处理下根系发育相关的 *ARF* 基因在杂交种中有更显著的表达,这为 *ARF* 基因在抗旱胁迫下的挖掘和利用提供了理论与试验依据。

#### 参考文献

- [1] Hagen G, Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(3-4): 373-385
- [2] Lee D J, Park J W, Lee H W, et al. Genome-wide analysis of the auxin-responsive transcriptome downstream of *iaaL* and its expression analysis reveal the diversity and complexity of auxin-regulated gene expression[J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(13): 3935-3957
- [3] 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
- [4] 李静, 崔继哲, 弭晓菊. 生长素与植物逆境胁迫关系的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, 6(6): 13-16
- [5] Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 533-543
- [6] Guilfoyle T J, Hagen G. Auxin response factors[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(5): 453-460
- [7] 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
- [8] Wang D, Pei K, Fu Y, et al. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Gene*, 2007, 394(1-2): 13-24
- [9] Xing H, Pudake R N, Guo G, et al. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 178
- [10] Kalluri U C, Difazio S P, Brunner A M, et al. Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa* [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7(1): 59
- [11] Li S B, Ouyang W Z, Hou X J, et al. Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 119
- [12] Wei H, Jiao Z, Hou X, et al. The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 742
- [13] Dubrovsky J G, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, et al. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(25): 8790-8794
- [14] Weijers D, Schlereth A, Ehrismann J S, et al. Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(2): 265-270
- [15] Huang D, Wu W, Abrams S R, et al. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(11): 2991-3007
- [16] Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. *Plant J*, 2002, 31(3): 279-292
- [17] Chen L, Ren F. Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought, stresses in *Brassica napus* [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2010, 42(2): 154-164
- [18] Seo P J, Xiang F, Qiao M, et al. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 275-289
- [19] Seo P J, Park C M. Auxin homeostasis during lateral root development under drought condition[J]. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(10): 1002-1004
- [20] Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, et al. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 118-130
- [21] Okushima Y, Overvoorde P J, Arima K, et al. Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*; unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463
- [22] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204-2216
- [23] Wilmoth J C, Wang S C, Tiwari S B, et al. NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation[J]. *Plant J*, 2005, 43(1): 118-130
- [24] Avni R, Nave M, Barad O, et al. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication[J]. *Science*, 2017, 357(6346): 93-97
- [25] Brechley R, Spannagl M, Pfeifer M, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. *Nature*, 2012, 491(7426): 705-710
- [26] Jia J, Zhao S, Kong X, et al. Aegilops tauschii draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation [J]. *Nature*, 2013, 496(7443): 91-95
- [27] Ling H Q, Zhao S, Liu D, et al. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu* [J]. *Nature*, 2013, 496(7443): 87-90
- [28] Consortium I W G S. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1251788
- [29] Luo M C, Gu Y Q, You F M, et al. A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(19): 7940-7945
- [30] Choulet F, Alberti A, Theil S, et al. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1249721
- [31] Marcussen T, Sandve S R, Heier L, et al. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1250092
- [32] Pfeifer M, Kugler K G, Sandve S R, et al. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1250091
- [33] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, 215(3): 403-410
- [34] Sato Y, Nishimura A, Ito M, et al. Auxin response factor family in rice [J]. *Genes Genet Syst*, 2001, 76(6): 373-380
- [35] Kent W J. BLAT—the BLAST-like alignment tool [J]. *Genome*



- Res, 2002, 12(4): 656-664
- [36] Punta M, Coggill P C, Eberhardt R Y, et al. The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 290-301
- [37] Edgar R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1792-1797
- [38] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874
- [39] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425
- [40] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791
- [41] O'Brien K P, Remm M, Sonnhammer E L. Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 476-480
- [42] Alexeyenko A, Tamas I, Liu G, et al. Automatic clustering of orthologs and inparalogs shared by multiple proteomes[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(14): 9-15
- [43] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1639-1645
- [44] Cock P J, Antao T, Chang J T, et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1422-1423
- [45] Livark K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [46] 赵艳, 瓮巧云, 马海莲, 等. 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
- [47] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(10): 5844-5849
- [48] Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 533-543
- [49] Tiwari S B, Wang X J, Hagen G, et al. Aux/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2809-2822
- [50] Wang S, Tiwari S B, Hagen G, et al. AUXIN RESPONSE FACTOR7 restores the expression of auxin-responsive genes in mutant *Arabidopsis* leaf mesophyll protoplasts[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 1979-1993
- [51] Swanson-Wagner R A, Jia Y, DeCook R, et al. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize  $F_1$  hybrid and its inbred parents[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 6805-6810
- [52] Zhang H Y, He H, Chen L B, et al. A genome-wide transcription analysis reveals a close correlation of promoter INDEL polymorphism and heterotic gene expression in rice hybrids[J]. *Mol Plant*, 2008, 1(5): 720-731