

番茄 B3 超家族成员鉴定及生物信息学分析

孙亭亭, 王大伟, 龚达平, 陈 乐, 陈雅琼, 孙玉合

(中国农业科学院烟草研究所/烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 青岛 266101)

摘要: B3 超家族是一类含有 B3 功能域(与 DNA 结合的高度保守结构域)的转录因子, 在植物生长发育过程中起重要作用。本研究采用生物信息学的方法, 利用 Pfam 中的 B3 保守结构域序列检索番茄(*Solanum lycopersicum* L.) 蛋白序列, 确定了 97 个 B3 超家族基因。对番茄 B3 超家族成员进行了系统进化树分析、染色体定位、结构域分析、组织表达和诱导表达分析等。番茄 B3 超家族分为 LAV、ARF、RAV 和 REM 4 个亚家族, 每个亚家族中的数量分别为 4、22、9 和 62 个, 且在进化树中形成明显不同的分支, 每个亚家族都进行了系统进化和结构域分析; 番茄 12 条染色体都含有 B3 超家族基因; 11 个成员的表达模式表明, B3 超家族同一亚家族成员也具有不同的时空表达模式; 在干旱、盐和高温胁迫处理下, 部分成员响应强烈并且响应不同的外界信号; 而对于 ABA 处理响应非常弱。本研究将为 B3 基因超家族成员的生物学功能研究提供参考。

关键词: 番茄; B3 超家族; 生物信息学

Genome-wide Identification and Bioinformatic Analysis of B3 Superfamily in Tomato

SUN Ting-ting, WANG Da-wei, GONG Da-ping, CHEN Le, CHEN Ya-qiong, SUN Yu-he

(Key Laboratory of Tobacco Gene Resources, Institute of Tobacco Sciences,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101)

Abstract: The B3 superfamily plays important roles in plant growth and development, especially in related signal transduction pathway as a kind of transcription factors. All members of the B3 superfamily share the B3 DNA-binding domain of approximately 110 amino acids. 97 members of the tomato B3 superfamily were all confirmed according to BLAST from the protein databases of tomato using the conserved B3 domain. Phylogenetic trees, chromosomal localization, function domain of all B3 members, tissue and induced expression patterns of partial B3 members were all analyzed. All the members were divided into four subfamilies, including LAV, ARF, RAV and REM, with 4, 22, 9 and 62 members, respectively. The branch of each subfamily was obviously distinguished from others in the phylogenetic tree, with analyzing the function domains of all members. All members of the B3 superfamily were assigned to each chromosome, and each subfamily distributed in different patterns and frequency. The expression patterns of 11 B3 superfamily members indicated that the members in the same subfamily had different spatial and temporal expression profiles. When treated by drought, NaCl, and high temperature, each member responded to different stress signals, and some were intense and significant. However, the response to ABA treatment was very weak. Our research would provide references to the studies on biological functions of B3 superfamily members in tomato.

Key words: *Solanum lycopersicum* L.; B3 superfamily; bioinformatics

B3 超家族是一类含有 B3 功能域(与 DNA 结合的高度保守结构域)的转录因子, 普遍存在于植物

收稿日期: 2014-07-21 修回日期: 2014-09-28 网络出版日期: 2015-06-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150611.0941.006.html>

基金项目: 国家“863”计划(2012AA021801)

第一作者研究方向为烟草功能基因组学。E-mail: qing.dt@163.com; 王大伟为共同第一作者

通信作者: 孙玉合, 研究方向为烟草功能基因组学。E-mail: yhsun@163.com

基因组中,是植物中特有的转录因子之一^[1-5]。拟南芥和水稻中分别含有 118 和 91 个 B3 超家族成员,在绿藻、苔藓植物和裸子植物中也发现了 B3 家族基因。B3 超家族含有 LAV (LEAFY COTYLEDON2 [LEC2]-ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 [ABI3]-VAL)、ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR)、RAV (RELATED TO ABI3 AND VP1) 和 REM (REPRODUCTIVE MERISTEM) 4 个亚家族。LAV、ARF 2 个亚家族目前研究较多,但是关于 RAV、REM 的研究非常少。

拟南芥中的 LAV 亚家族分为 LEC2-ABI3 和 VAL 两组。其中 LEC2 相关成员只含有 B3 功能域,而 ABI3 则含有与 VP1 相同的 3 个结构域:B1、B2 和 B3;VAL 则包含 3 个功能域:类 CW 锌指结构、EAR (ethylene response factor [ERF]-associated amphiphilic repression) 基序和类 PHD (plant homeodomain) 功能域。其中,ABI3 基因调控种子萌发过程中的脱落酸响应基因;LEC2 和 FUS3 基因促进胚胎发育,LEC2 还能调控激素的合成;这 3 个基因只在种子中大量表达。VAL 基因能够抑制胚胎发育,在顶端分生组织和种子中大量表达^[5-10]。拟南芥中的大多数 ARF 成员含有 B3 功能域和 1 个具有转录激活或抑制活性的中心功能域;其中大多数还含有 2 个 C 端功能域(III 和 IV 功能域),与 ARF 蛋白本身或者 AUX-IAA 形成二聚体。前人研究显示,AtARF1 和 AtARF2 基因参与花器官衰老与脱落过程^[5];AtARF6 和 AtARF8 基因调控逆境胁迫相关茉莉酸的合成^[11];AtARF5 和 AtARF7 基因能够促进极性生长,促进细胞扩增^[12];AtARF19 和 AtARF7 基因促进侧根的形成,在激素信号通路中发挥重要作用。拟南芥 13 个 RAV 家族成员中有 6 个除了含有 B3 功能域外,还含有 AP2 (APETALA2) 结构域。其中 RAV1 基因可能作为植物生长和开花时间的负调控因子起作用,在各个组织中均大量表达;TEM1 和 TEM2 基因在控制开花时间和花器官转换中起作用,在根和叶片中高量表达;nga 突变体表现出叶型和花器官缺陷表型,包括多花、多重萼片和绿色花瓣等,相关 NGAI 基因在花中大量表达;这些结果表明 RAV 家族在叶、花发育方面起着非常重要的作用^[13-16]。拟南芥中 REM 家族只含有 B3 功能域,但成员之间在 B3 功能域的个数上存在较大差异,因此依据系统进化树将其分为 6 组。该家族中唯一确定功能的基因是 VRNI,该基因结合到 DNA 上以维持春化作用,在各个组织中大量表达^[17]。

番茄是一种常见的茄科属经济作物,研究番茄

B3 超家族基因分布、结构域、染色体分布与表达分析,对研究 B3 超家族成员在番茄生长发育中的作用具有非常重要的意义。番茄 B3 超家族在基因组层面上的研究还未见报道。因此,本研究采用生物信息学方法,分析鉴定番茄全基因组序列中的 B3 超家族成员,从基因组水平上分析 B3 超家族成员的数目、结构域及表达模式,为研究 B3 超家族成员在番茄生长发育中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 番茄基因组及功能注释信息

在番茄基因组数据库 ITAG (ftp://ftp.solgenomics.net/tomato_genome) 下载番茄基因组序列、蛋白序列及基因注释信息^[18]。基因芯片数据来自 Genevestigator (<http://www.genevestigator.com/gv/>) 的番茄基因芯片平台^[19]。

1.2 基因家族序列鉴定

在 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 数据库中下载 B3 超家族种子序列 (PF02362), 利用 HMMER 软件检索番茄蛋白序列, 所得结果在 Pfam 数据库中进行结构域预测, 删除不含有 B3 结构域的成员; 根据拟南芥和水稻中的亚家族分类方法, 将候选序列归类到 4 个亚家族中。利用 ExPASy Proteomics (<http://expasy.org/>) 在线程序对所有基因进行分子量、等电点预测^[20]。

1.3 进化树与结构域分析

利用 MUSCLE^[21] 程序对各个亚家族进行序列比对分析, 所得结果用 MEGA 5^[22] 软件构建邻接树, 校验参数 Bootstrap 重复 1000 次。根据 Pfam 数据库中提供的结构域位置信息, 绘制结构域图。

1.4 染色体定位

利用 Perl 程序解析番茄基因组信息文件, 确定 B3 超家族成员的染色体位置, 利用 MapDraw^[23] 软件将 B3 成员定位到番茄 12 条染色体上, 并绘制图谱。

1.5 基因表达模式

在 Genevestigator 番茄芯片平台手动搜索与 B3 超家族基因匹配的芯片数据, 利用 Genevestigator 所提供的工具进行诱导表达及基因表达分析。

2 结果与分析

2.1 番茄 B3 家族蛋白的鉴定及分类

本研究在番茄基因组中共鉴定出 97 个 B3 超家族基因。通过将每一个成员与拟南芥中同源基因进行比对分析和结构域分析, 97 个超家族成员分别归

类到 LAV、ARF、RAV 和 REM 4 个亚家族(表 1)。其中 REM 亚家族成员最多,为 62 个;其次是 ARF 亚家族,为 22 个;RAV 家族 9 个成员,LAV 家族最少,为 4 个成员。蛋白质生化属性分析发现,最长的番茄 B3 蛋白为 Solyc02g021260. 1. 1 (REM 亚家族) 包含 1317 个氨基酸残基,最短的 B3 蛋白为

Solyc01g096790. 2. 1 (REM 亚家族),只有 92 个氨基酸残基,其等电点范围从 4. 23 (Solyc02g032070. 1. 1 REM 亚家族) 到 9. 9 (Solyc12g007300. 1. 1 REM 亚家族) 不等。初步的序列比对和结构域分析结果表明,本研究检索到的 B3 超家族成员可信度较高,可以进行后续的信息学分析。

表 1 番茄 B3 基因家族信息分析

Table 1 Information analysis of tomato B3 family

基因登录号	亚家族	大小 (aa)	分子量	等电点	拟南芥 同源基因	基因登录号	亚家族	大小 (aa)	分子量	等电点	拟南芥 同源基因
Gene accession No.	Family	Size	Molecular weight	Isoelectric point	<i>Arabidopsis</i> homologous gene	Gene accession No.	Family	Size	Molecular weight	Isoelectric point	<i>Arabidopsis</i> homologous gene
Solyc00g196060. 2. 1	ARF	354	39746. 2	9. 32	AT1G30330	Solyc01g108120. 2. 1	REM	295	33701. 8	9. 34	AT1G26680
Solyc01g096070. 2. 1	ARF	689	76963. 9	6. 09	AT3G61830	Solyc01g108130. 2. 1	REM	336	38579	9. 31	AT3G18990
Solyc01g103050. 2. 1	ARF	654	72605	6. 14	AT1G59750	Solyc01g108140. 2. 1	REM	224	25960. 7	8. 69	AT3G18990
Solyc02g037530. 2. 1	ARF	842	94276. 7	5. 96	AT5G37020	Solyc01g108930. 2. 1	REM	285	32498. 1	9. 16	AT3G18990
Solyc02g077560. 2. 1	ARF	747	81462. 8	7. 03	AT2G33860	Solyc01g108940. 1. 1	REM	372	43605	6. 37	AT3G18990
Solyc03g031970. 2. 1	ARF	844	94446	5. 85	AT5G37020	Solyc01g108950. 1. 1	REM	347	40702. 2	4. 98	AT4G31690
Solyc03g118290. 2. 1	ARF	846	94013. 5	6. 3	AT5G62000	Solyc01g109030. 2. 1	REM	208	24501. 8	7. 97	AT4G31640
Solyc04g081240. 2. 1	ARF	930	103036. 5	5. 39	AT1G19850	Solyc02g021260. 1. 1	REM	1317	147503. 4	9. 83	AT3G18990
Solyc05g047460. 2. 1	ARF	1097	120897. 1	5. 96	AT1G19220	Solyc02g026080. 1. 1	REM	345	40228. 3	6. 7	AT2G16210
Solyc05g056040. 2. 1	ARF	650	74231. 9	5. 42	AT2G46530	Solyc02g032070. 1. 1	REM	108	11958	4. 23	AT3G18990
Solyc06g075150. 2. 1	ARF	671	74911	5. 69	AT4G30080	Solyc02g055370. 2. 1	REM	122	14573. 5	4. 95	AT4G31690
Solyc07g016180. 2. 1	ARF	1112	123332. 3	6. 18	AT1G19220	Solyc02g065310. 1. 1	REM	227	26048. 8	8. 56	AT3G18990
Solyc07g042260. 2. 1	ARF	1137	127856. 2	6. 17	AT1G19220	Solyc02g065340. 1. 1	REM	278	32295. 9	9. 73	AT2G24645
Solyc07g043620. 2. 1	ARF	525	58646. 9	8. 41	AT1G30330	Solyc02g065350. 2. 1	REM	331	38191. 4	5. 77	AT3G18990
Solyc08g008380. 2. 1	ARF	683	76145. 6	5. 69	AT4G23980	Solyc02g081780. 1. 1	REM	293	33860. 1	9. 31	AT4G31680
Solyc08g082630. 2. 1	ARF	644	72370. 4	8. 11	AT4G23980	Solyc02g090170. 2. 1	REM	366	43045. 3	8. 96	AT3G18990
Solyc09g007810. 2. 1	ARF	694	76222. 2	6. 64	AT4G30080	Solyc02g090710. 2. 1	REM	526	59424. 2	8. 41	AT5G09780
Solyc10g086130. 1. 1	ARF	631	70644. 8	6. 84	AT4G30080	Solyc03g007140. 2. 1	REM	468	52263. 8	6. 14	AT3G18990
Solyc11g013480. 1. 1	ARF	342	38288. 7	7. 71	AT1G77850	Solyc03g042500. 1. 1	REM	203	23352	4. 38	AT3G18990
Solyc11g069190. 1. 1	ARF	811	90330. 8	5. 86	AT5G60450	Solyc03g042510. 1. 1	REM	193	22224. 8	4. 46	AT3G18990
Solyc11g069500. 1. 1	ARF	699	76990. 2	8. 44	AT2G28350	Solyc03g043580. 1. 1	REM	323	36851. 8	4. 84	AT3G18990
Solyc12g042070. 1. 1	ARF	828	92468. 2	6. 45	AT5G62000	Solyc03g044110. 1. 1	REM	323	36879. 7	4. 92	AT4G31640
Solyc02g079020. 2. 1	LAV	1043	114545. 7	5. 87	AT2G30470	Solyc03g111410. 2. 1	REM	343	38855. 3	8. 43	AT2G35310
Solyc02g094460. 1. 1	LAV	274	31324. 9	4. 73	AT3G26790	Solyc03g111500. 2. 1	REM	501	55914. 9	8. 08	AT3G18990
Solyc06g082520. 2. 1	LAV	845	93502. 3	6. 48	AT2G30470	Solyc04g015500. 2. 1	REM	217	24593	5. 22	AT3G18990
Solyc10g075030. 1. 1	LAV	879	97203. 3	6. 51	AT4G32010	Solyc04g064830. 2. 1	REM	255	28846. 2	9. 31	AT4G31690
Solyc12g098460. 1. 1	RAV	209	23499. 2	5. 61	AT1G51120	Solyc04g079130. 2. 1	REM	267	30691. 2	9. 82	AT3G18990
Solyc03g083110. 1. 1	RAV	335	38721. 4	6. 17	AT1G51120	Solyc04g079590. 2. 1	REM	580	64255. 9	6. 95	AT3G18990
Solyc04g007000. 1. 1	RAV	372	42221. 9	9. 15	AT1G13260	Solyc05g041100. 1. 1	REM	227	26522. 4	4. 88	AT2G16210
Solyc05g009790. 1. 1	RAV	395	44382. 2	9. 35	AT1G13260	Solyc06g007530. 2. 1	REM	293	33722. 3	9. 24	AT3G18990

表 1(续)

基因登录号	亚家族	大小 (aa)	分子量	等电点	拟南芥 同源基因	基因登录号	亚家族	大小 (aa)	分子量	等电点	拟南芥 同源基因
Gene accession No.	Family	Size	Molecular weight	Isoelectric point	<i>Arabidopsis</i> homologous gene	Gene accession No.	Family	Size	Molecular weight	Isoelectric point	<i>Arabidopsis</i> homologous gene
Solyc08g013690.1.1	RAV	324	36671.7	7.72	AT1G01030	Solyc06g034140.1.1	REM	445	49929.2	5.81	AT5G32460
Solyc08g013700.1.1	RAV	294	33708.5	8.36	AT1G01030	Solyc06g074160.1.1	REM	254	29496.7	5.64	AT4G31680
Solyc08g083400.2.1	RAV	334	37826.8	6.87	AT2G46870	Solyc07g017470.1.1	REM	96	10748.1	4.62	AT4G31650
Solyc09g010230.1.1	RAV	345	39112.6	7.02	AT5G06250	Solyc07g054630.2.1	REM	578	66046.5	9.56	AT3G18990
Solyc10g083210.1.1	RAV	308	35139.4	6.42	AT5G06250	Solyc08g006190.1.1	REM	544	62314.5	9.24	AT2G24700
Solyc06g083590.2.1	REM	579	65439.5	6.58	AT1G25560	Solyc08g006200.1.1	REM	566	65675.8	7.58	AT1G26680
Solyc06g083600.1.1	REM	620	70492.8	5.43	AT1G25560	Solyc08g006210.1.1	REM	401	46314	8.8	AT2G24700
Solyc00g011550.1.1	REM	193	22224.8	4.46	AT3G18990	Solyc08g006220.2.1	REM	246	28600.9	9.49	AT2G24700
Solyc00g011660.1.1	REM	310	35535.1	4.68	AT3G18990	Solyc08g006230.2.1	REM	334	38881.2	6.33	AT4G31690
Solyc00g057280.1.1	REM	160	18551.4	6.3	AT2G24650	Solyc08g006240.1.1	REM	504	58981.9	9.42	AT2G24700
Solyc01g015210.1.1	REM	284	32630.3	5.61	AT3G18990	Solyc08g006260.1.1	REM	251	29393.4	5.88	AT2G24645
Solyc01g060370.1.1	REM	97	10814.1	4.62	AT2G24650	Solyc08g006270.1.1	REM	195	22405.7	8.94	AT4G31615
Solyc01g079560.2.1	REM	109	12725.3	5.14	AT3G18990	Solyc08g006280.1.1	REM	565	65488.6	9.17	AT4G00260
Solyc01g081400.2.1	REM	167	18428.8	5.27	AT3G18990	Solyc08g006490.1.1	REM	276	32330.1	9.57	AT4G31690
Solyc01g095880.1.1	REM	179	20749.7	9.17	AT2G31720	Solyc08g029090.2.1	REM	584	66127.8	9.08	AT3G18990
Solyc01g096790.2.1	REM	92	10563	5.34	AT3G18990	Solyc08g068540.2.1	REM	499	56980.4	9.33	AT3G18990
Solyc01g106230.2.1	REM	336	39540.3	5.76	AT3G18990	Solyc10g053890.1.1	REM	166	19263.3	6.31	AT3G53310
Solyc01g106250.2.1	REM	336	39540.3	5.76	AT3G18990	Solyc11g045450.1.1	REM	297	34538.8	4.8	AT3G18990
Solyc12g007300.1.1	REM	235	26592.5	9.9	AT4G03160						

2.2 基因家族系统进化树分析

拟南芥和水稻中 B3 超家族的研究发现,B3 超家族成员分成 ARF、LAV、RAV、REM 4 个亚家族,其中 REM 亚家族又分成 REM A-F 6 个小家族。本研究对番茄 B3 超家族成员构建系统发生树,从发生树中看出番茄 B3 超家族成员在各个家族都有分布(表 2,图 1),在 LAV、ARF、RAV 和 REM 亚家族中分别有 4、22、9 和 62 个成员。通过蛋白结构域预测分析发现(图 1),LAV 亚家族中含有 B3 与 CW 锌指结构域,3 个 LAV 成员都含有这 2 个结构域,1 个基因不含 CW 锌指结构。RAV 亚家族包含 B3 与 AP2 结构域,其中 5 个 RAV 成员只含有 B3 结构域,3 个成员同时包含了 B3 与 AP2 结构域。ARF 家族包含 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 结构域(C 端 III 和 IV 功能域),其中 6 个 ARF 成员含有 B3 与 Auxin_resp 结构域,16 个基因都含有 B3、Auxin_resp 和 AUX_IAA 这 3 个结构域。REM 亚家族成员只含有 B3 结构域。系统进化树分析结果与初步的鉴定结果(表 1)一致。

表 2 拟南芥、水稻和番茄各家族 B3 基因数量

Table 2 The number of B3 gene in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Solanum lycopersicum*

家族	拟南芥	水稻	番茄
Family	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
VAL	3	2	3
LEC2/ABI3	3	5	1
RAV	13	16	9
ARF	23	28	22
REMA	6	16	12
REMB	19	2	9
REMC	18	5	13
REMD	1	7	4
REME	3	10	11
REMF	29	0	13
合计 Total	118	91	97

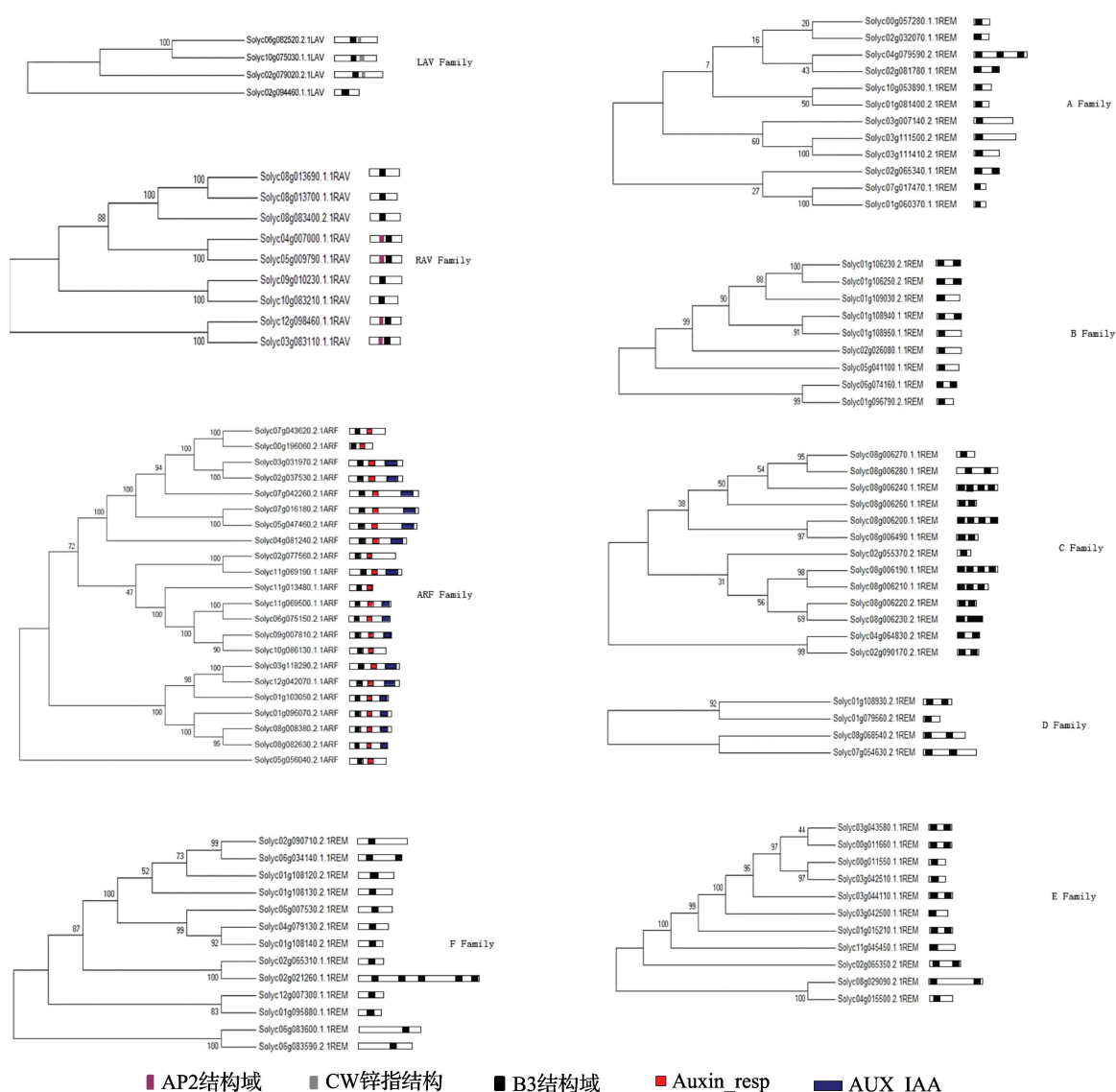


图1 LAV、RAV、ARF 和 REM 亚家族进化树及结构域分布

Fig.1 Evolutionary tree and domain distribution of LAV、RAV、ARF and REM subfamily

2.3 番茄 B3 超家族染色体定位分析

根据番茄基因组中的基因注释信息,将 97 个 B3 成员定位到 12 条番茄染色体上,得到染色体定位图(图 2)。通过染色体定位图分析发现,1、8 号染色体上有 17 个 B3 超家族成员,9 号染色体上有 2 个成员;REM 亚家族成员主要聚集在 1、2 和 8 号染色体上;LAV 亚家族成员主要分布在 6 号染色体上,在 2 和 10 号染色体上分别有 1 条 LAV 家族成员;RAV 亚家族主要分布在 8 号染色体上,在 3、4、5、9 和 10 号染色体上分别有 1 条 RAV 亚家族成员;ARF 基因平均分布在每条染色体上。

2.4 表达模式分析

本研究通过 Genevestigator 提供的番茄基因芯

片,将 B3 超家族基因对应的芯片数据进行聚类分析,在图中基因表达的强弱由颜色的深度表示(图 3)。通过对内源基因表达的聚类分析发现,LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1* 在各生长阶段中都表达,尤其在果实形成阶段和花、果实、根中大量表达。ARF 家族中,*Solyc08g082630.2.1* 则在果实形成、成熟发育阶段表达量高,在花、幼苗、心皮、果实、根和侧根营养器官中的表达量高,其余组织中的表达量非常低;*Solyc02g077560.2.1* 在发育阶段及营养器官中大量表达,在主茎发育阶段和果实营养器官中大量表达;*Solyc01g103050.2.1* 在果实成熟发育阶段和根部营养器官中大量表达;*Solyc03g031970.2.1* 在开放花及果实形成发育阶段大量表达,在心皮营养器官中大量表

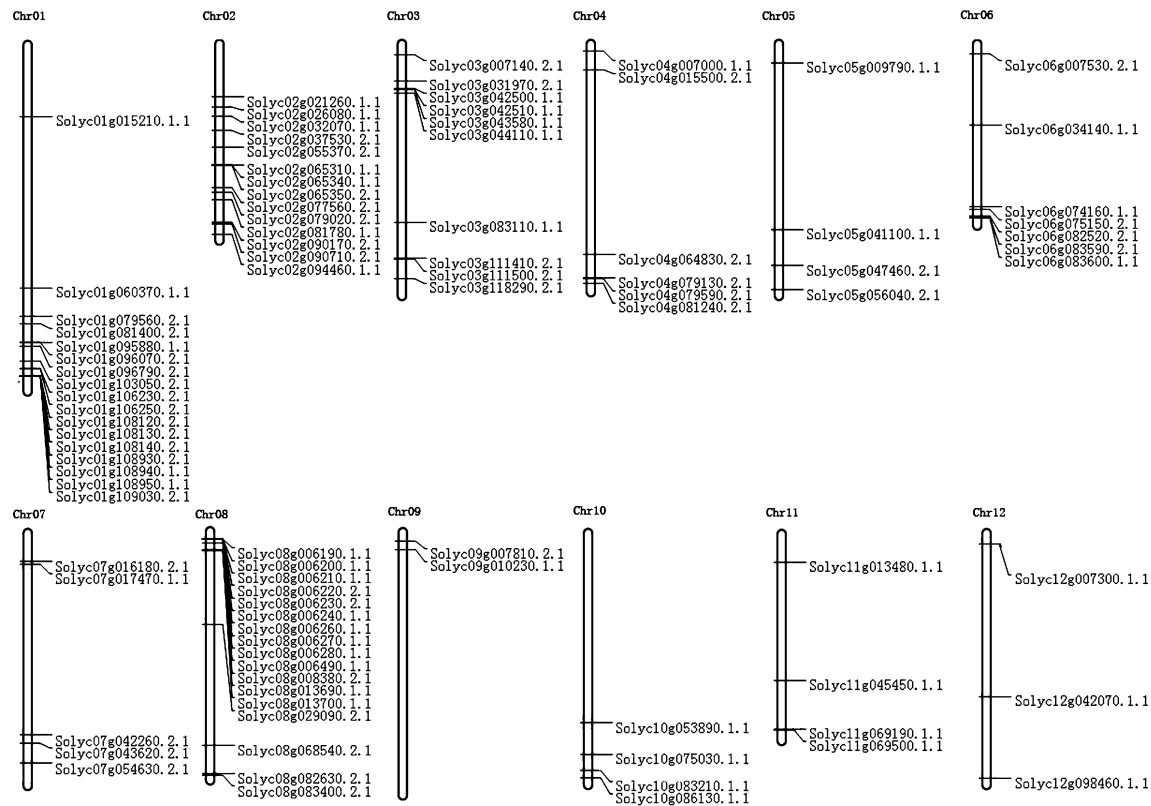


图2 B3 超家族染色体定位信息

Fig. 2 Location information of B3 family chromosomal

达。RAV 家族中的 *Solyc04g007000.1.1* 在开放花和果实成熟发育阶段上调表达,在子叶和下胚轴营养器官中高量表达。在 REM 家族中,*Solyc01g108120.2.1* 在主茎、花序和果实成熟发育阶段大量表达,在花、外果皮和果肉营养器官中高量表达;*Solyc06g007530.2.1* 在各发育阶段都大量表达,在心皮和根尖营养器官中高量表达;*Solyc04g064830.2.1* 在各发育阶段都微量表达,在果肉及根中高量表达;*Solyc01g106230.2.1* 在主茎发育阶段和根尖、花和果实营养器官中高量表达,其他发育阶段和营养器官中表达量较低;*Solyc03g007140.2.1* 在主茎发育阶段和果实果肉营养器官中高量表达。内源表达模式结果表明,同一家族的不同基因在时空表达模式上也有所区别。

本研究还分析了 B3 超家族在不同诱导处理下的表达模式,处理包括盐(200mmol/L NaCl)、干旱(DSG)、高温(40℃)和 ABA(10mg/L)。研究发现,在盐处理中,REM 家族中的 *Solyc01g108120.2.1*、*Solyc04g064830.2.1* 和 *Solyc01g106230.2.1* 表达量上调,*Solyc06g007530.2.1* 表达量轻微下调;LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1* 表达量明显上调;ARF

家族中的 *Solyc03g031970.2.1* 表达量稍微下调。干旱处理中,RAV 家族中的 *Solyc04g007000.1.1* 表达量轻微下调;ARF 家族中的 *Solyc08g082630.2.1* 表达量显著下调,*Solyc03g031970.2.1* 表达量轻微下调,*Solyc02g077560.2.1* 轻微上调;REM 家族中的 *Solyc01g108120.2.1* 表达量显著上调,*Solyc06g007530.2.1* 显著下调,*Solyc04g064830.2.1* 和 *Solyc03g007140.2.1* 轻微上调。高温条件下,LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1* 和 RAV 家族中的 *Solyc04g007000.1.1* 表达量显著上调;ARF 家族中的 *Solyc02g077560.2.1* 表达量轻微上调;REM 家族中 *Solyc03g007140.2.1* 显著下调。ABA 处理后,LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1* 和 ARF 家族中的 *Solyc01g103050.2.1* 轻微下调;REM 家族中的 *Solyc01g108120.2.1* 和 *Solyc06g007530.2.1* 轻微上调。综上分析,11 个 B3 超家族成员对于干旱胁迫的诱导响应最强烈,盐胁迫和高温胁迫次之,对 ABA 处理的诱导响应最弱。其中,8 个 ARF 和 REM 亚家族成员对于干旱胁迫的响应最强烈,6 个 LAV 和 REM 亚家族成员对响应盐胁迫处理,4 个 LAV、RAV 和 REM 亚家族成员对高温胁迫响应最强烈。

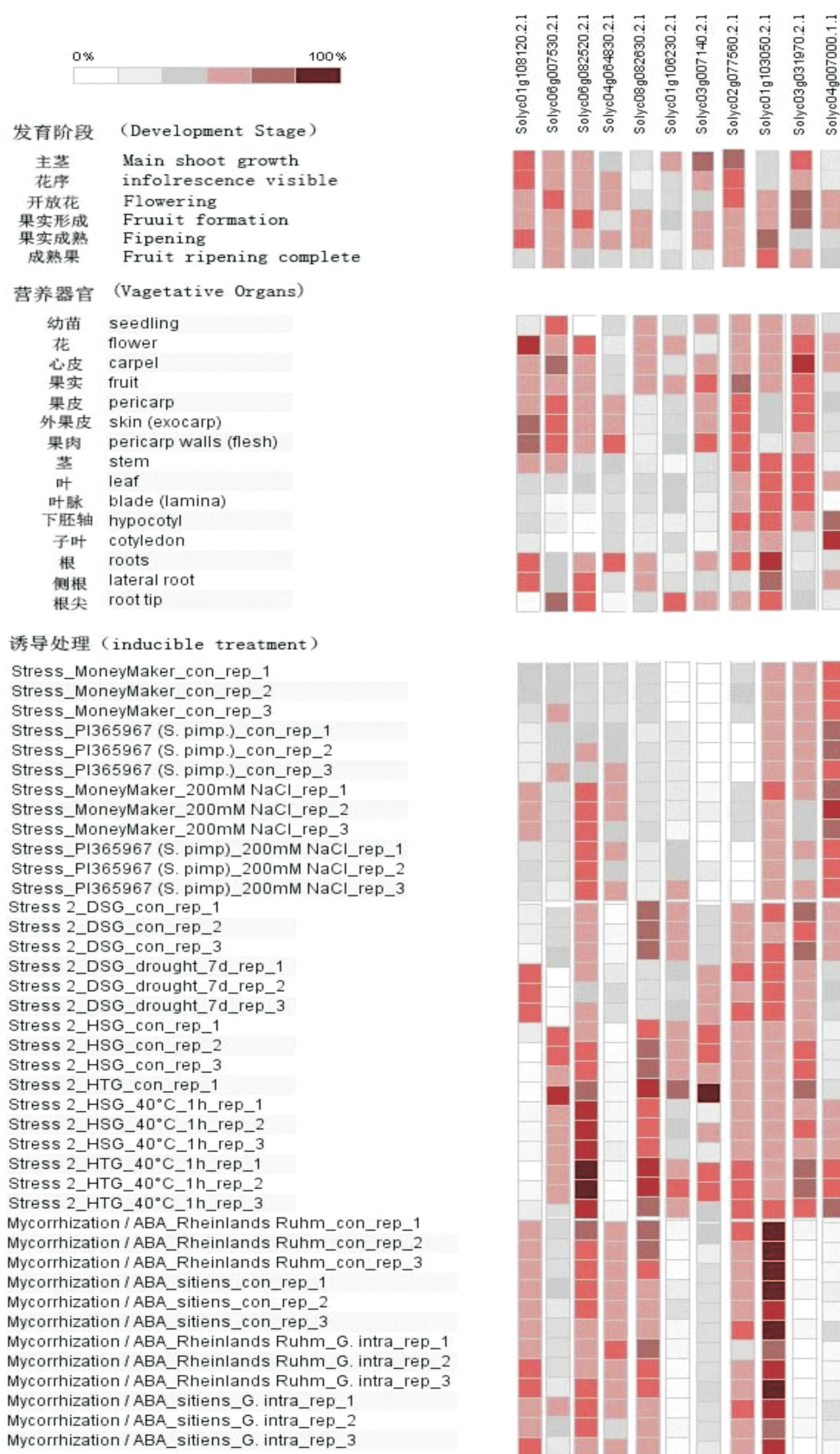


图3 组织表达及响应表达模式

Fig.3 The model of tissue expression and response expression

3 讨论

基因组计划完成后,从全基因组水平研究基因家族的分类、序列特点、进化特征和功能预测等成为生物学领域所关注的重要问题。前人研究表明,B3 超家族在植物生长发育过程中起重要作用。本研究从全基因组水平上鉴定番茄中的 B3 超家族基因,共得到 97 个 B3 超家族基因。根据与拟南芥同源基因的比对,将这些成员分为 LAV、ARF、RAV 和 REM 4 个亚家族,将这些亚家族作进化树分析发现,每个亚家族之间的保守性较高。部分成员的内源表达模式具有不同的特点,并且诱导表达模式表明不同成员响应不同的胁迫诱导处理。

目前,B3 超家族基因在拟南芥中研究的较为深入,通过 Blast 比对搜索番茄 B3 超家族的同源基因。根据聚类分析和拟南芥中 B3 超家族基因功能注释推测番茄 B3 成员可能的功能。系统发生分析结果表明,番茄 B3 超家族成员同一类亚家族成员都能较好地聚为一类,并且相应的结构域类型与前人研究基本一致^[5]。但部分家族的功能域或成员分布与拟南芥中的同源家族略有差别。如 LAV 家族中,LEC2-ABI3 亚族只含有 1 个成员,并且只含有 B3 功能域。根据前人研究,拟南芥和水稻中各只有一个 ABI 3 同源基因^[5],因此推测,番茄中可能缺乏 ABI3 同源的 B3 成员,或者番茄中的类似成员丢失了 B3 结构域。

M. F. Wu 等^[24]发现拟南芥中的 *AtARF6* (*Atlg30330*) 基因调控种子心皮发育、促进花器官成熟并且能够响应逆境胁迫,而通过 Blast 比对分析,发现番茄中的 *Solyc00g196060.2.1* (ARF) 和 *Solyc07g043620.2.1* (ARF) B3 成员与 *AtARF6* 基因高度同源,据报道,*AtARF6* 基因在拟南芥中能够促进开花、果实成熟,并且能够响应逆境胁迫。Y. Okushima 等^[25]和 Z. H. Feng 等^[26]研究发现,拟南芥中 *AtARF11* (*Atlg19220*) 基因促进侧根形成,在激素信号途径中起关键作用,而在番茄中发现该基因的同源基因有 *Solyc05g047460.2.1* (ARF)、*Solyc07g016180.2.1* (ARF) 和 *Solyc07g042260.2.1* (ARF)。通过 Blast 分析,番茄中 LAV 亚家族中的 *Solyc02g094460.1.1* 与拟南芥中 LAV 基因 *AtFUS3* (*AT3G26790*) 高度同源,M. Sugliani 等^[6]和 R. S. Chiu 等^[7]研究发现 *AtFUS3* 基因参与种子的发育过程。LAV 亚家族中的其他成员与拟南芥中抑制分生组织发育的 VAL 基因高度同源。拟南芥中的 *At-*

RAVI (*AT1G13260*) 基因在番茄中 RAV 亚家族的同源基因为 *Solyc05g009790.1.1* (RAV) 和 *Solyc04g007000.1.1* (RAV),*AtRAVI* 基因促进叶片早衰进入衰老时期并且能响应激素调控。H. Tsukagoshi 等^[27]、Y. Y. Levy 等^[28]和 H. R. Woo 等^[29]研究发现拟南芥中 *AtREM39* (*AT3G18990*) 可维持春化作用,促进花芽形成和花器官发育,通过 Blast 比对发现番茄 REM 亚家族中存在 30 个 B3 同源基因,这些番茄 B3 超家族成员也有可能调控番茄花芽形成及花器官发育过程。

本研究通过对番茄基因芯片分析发现,11 个 B3 基因对干旱、盐和高温胁迫具有较强烈响应,表明相应的部分成员可能与植物逆境胁迫响应有关。干旱胁迫诱导 ARF 家族中的 *Solyc08g082630.2.1*、*Solyc03g031970.2.1* 和 REM 家族中的 *Solyc01g108120.2.1*、*Solyc06g007530.2.1* 表达量显著变化,盐胁迫诱导 LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1* 和 REM 家族中的 *Solyc01g108120.2.1* 表达量显著上调,高温胁迫诱导 LAV 家族中的 *Solyc06g082520.2.1*、RAV 家族中的 *Solyc04g007000.1.1* 和 REM 家族中 *Solyc03g007140.2.1* 表达量显著变化。相反,11 个 B3 家族成员中只有 3 个对 ABA 处理具有微弱响应;由于番茄中没有检索到与 ABI3 同源的 B3 基因,因此推测番茄 B3 超家族成员可能没有直接参与 ABA 信号转导^[6],因此对于外源 ABA 的响应较弱。

本研究以番茄基因组序列为背景,对 B3 超家族成员做了相关的理化性质、功能域及进化树分析,确定了成员在染色体上的位置,通过芯片数据分析了部分成员的组织及诱导表达模式。本研究对番茄 B3 超家族成员有了初步了解,为今后 B3 超家族成员的功能研究奠定了基础。为了更好地了解番茄 B3 超家族成员的结构和功能,下一步将对相关基因进行克隆、表达模式分析及功能验证,以探索其具体的生物学功能。相关研究结果将为 B3 超家族基因调控番茄的发育研究提供理论参考。

参考文献

- [1] Kim S, Soltis P S, Wall K, et al. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family[J]. *Mol Biol Evol*, 2006, 23 (1): 107-120
- [2] Zhao L, Luo Q, Yang C, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean[J]. *Planta*, 2008, 227 (6): 1389-1399

- [3] Castillejo C, Pelaz S. A balance between CONSTANS and TEMPRANILLO directly control FT expression to trigger flowering [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(17):1338-1343
- [4] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, et al. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5):1134-1151
- [5] Swaminathan K, Peterson K, Jack T. The plant B3 superfamily [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(12):647-655
- [6] Sugliani M, Brambilla V, Clerckx E J, et al. The conserved splicing factor SUA controls alternative splicing of the developmental regulator ABI3 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(6):1936-1946
- [7] Chiu R S, Nahal H, Provart N J, et al. The role of the *arabidopsis* FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(15):1186-1471
- [8] Stone S L, Kwong L W, Yee K M, et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20):11806-11811
- [9] Giraudat J, Hauge B M, Walon C, et al. Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(10):1251-1261
- [10] Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, et al. FUSCA3 encodes a protein with a conserved VPI/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 15(6):755-764
- [11] Suzuki M, Wang H H, McCarty D R. Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by *VPI/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3* genes [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(2):902-911
- [12] Hardtke C S, Ckurshumova W, Vidaurre D P, et al. Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROUS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4 [J]. *Development*, 2004, 131(5):1089-1100
- [13] Magnani E, Sjolander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(9):2265-2277
- [14] Zhao L, Luo Q, Yang C, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean [J]. *Planta*, 2008, 227(6):1389-1399
- [15] Hu Y X, Wang Y X, Liu X F, et al. *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development [J]. *Cell Res*, 2004, 14(1):8-15
- [16] Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(2):470-478
- [17] Mylne J S, Mas C, Hil J M. NMR assignment and secondary structure of the C-terminal DNA binding domain of *Arabidopsis thaliana* VERNALIZATION1 [J]. *Biomol NMR Assign*, 2012, 6(1):5-8
- [18] Duvick J, Fu A, Muppirala U, et al. Plant GDB: a resource for comparative plant genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36:959-965
- [19] Hruz T, Laule O, Szabo G, et al. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes [J]. *Adv Bioinformatics*, 2008, doi:10.1155/2008/420747
- [20] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:597-603
- [21] Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5:113
- [22] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10):2731-2739
- [23] Liu R H, Meng J L. MapDraw: a microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data [J]. *Heredity*, 2003, 25(3):317-321
- [24] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA 167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction [J]. *Development*, 2006, 133(21):4211-4218
- [25] 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
- [26] Feng Z H, Zhu J, Du X L, et al. Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2012, 236(4):1227-1237
- [27] Tsukagoshi H, Morikami A, Nakamura K. Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7):2543-2547
- [28] Levy Y Y, Mesnage S, Mylne J S, et al. Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control [J]. *Science*, 2002, 297(5579):243-246
- [29] Woo H R, Kim J H, Kim J, et al. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(14):3947-3957