

# 番茄 WOX 转录因子家族的鉴定及其进化、表达分析

李晓旭<sup>1</sup>, 刘成<sup>1,2</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 张增林<sup>1</sup>, 高晓明<sup>1</sup>, 周慧<sup>1,3</sup>, 郭永峰<sup>1</sup>

1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业基因资源利用重点实验室, 青岛 266101;

2. 曲靖市烟草公司, 曲靖 655000;

3. 山东中烟颐中集团, 青岛 266101

**摘要:** WUSCHEL 相关的同源异型盒(WUSCHEL-related homeobox, WOX)是一类植物特异的转录因子家族, 具有调控植物干细胞分裂分化动态平衡等重要功能。本研究利用番茄(*Solanum lycopersicum*)基因组数据, 通过建立隐马尔科夫模型并进行检索, 鉴定了番茄 10 个 WOX 转录因子家族成员。多序列比对发现, 番茄 WOX 转录因子家族成员具有高度保守的同源异型结构域; 以拟南芥 WOX 转录因子家族成员序列为参照, 通过邻接法、极大似然法、贝叶斯法重建了系统发育树, 三者呈现出类似的拓扑结构, 番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族共 25 个成员被分为 3 个进化支(Clade)和 9 个亚家族(Subgroup); 利用 MEME 和 GSDS 对 WOX 转录因子家族成员的蛋白保守结构域和基因结构进行了分析, 同一亚家族内的 WOX 转录因子家族成员的保守结构域的种类、组织形式以及基因结构具有高度的一致性; 利用 Perl 和 Orthomcl 对家族成员的染色体定位和同源性关系进行分析, 结果表明串联重复的 *SIWOX3a* 和 *SIWOX3b* 可能来源于一次复制事件; 利用番茄转录组数据和 qRT-PCR 进行表达分析, 结果显示家族成员在不同组织中的表达存在差异, 暗示了 WOX 家族的不同成员在功能上可能具有多样性。本研究对番茄 WOX 转录因子家族成员进行 GO(Gene Ontology)注释和比较分析, 结果表明该家族成员作为转录因子, 可能在组织器官发育、细胞间通讯等过程中发挥作用。

**关键词:** 番茄; 生物信息学分析; WOX 转录因子家族

## Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the WOX family genes in *Solanum lycopersicum*

Xiaoxu Li<sup>1</sup>, Cheng Liu<sup>1,2</sup>, Wei Li<sup>1</sup>, Zenglin Zhang<sup>1</sup>, Xiaoming Gao<sup>1</sup>, Hui Zhou<sup>1,3</sup>, Yongfeng Guo<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Tobacco Gene Resources, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China;

2. Qujing Tobacco Company of Yunnan, Qujing 655000, China;

3. Etsong Qingdao Industrial Co., Ltd., Qingdao 266101, China

**Abstract:** Members of the plant-specific WOX transcription factor family have been reported to play important roles in cell to cell communication as well as other physiological and developmental processes. In this study, ten

收稿日期: 2015-12-14; 修回日期: 2016-01-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31571494)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31571494)]

作者简介: 李晓旭, 硕士研究生, 专业方向: 作物分子育种。E-mail: moxuanpds@163.com

通讯作者: 郭永峰, 博士, 研究员, 研究方向: 植物发育生物学。E-mail: guoyongfeng@caas.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-499

网络出版时间: 2016/3/31 11:08:56

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160331.1108.006.html>

members of the WOX transcription factor family were identified in *Solanum lycopersicum* with HMMER. Neighbor-joining phylogenetic tree, maximum-likelihood tree and Bayesian-inference tree were constructed and similar topologies were shown using the protein sequences of the homeodomain. Phylogenetic study revealed that the 25 WOX family members from *Arabidopsis* and tomato fall into three clades and nine subfamilies. The patterns of exon-intron structures and organization of conserved domains in *Arabidopsis* and tomato were consistent based on the phylogenetic results. Transcriptome analysis showed that the expression patterns of SIWOXs were different in different tissue types. Gene Ontology (GO) analysis suggested that, as transcription factors, the SIWOX family members could be involved in a number of biological processes including cell to cell communication and tissue development. Our results are useful for future studies on WOX family members in tomato and other plant species.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*; bioinformatics analysis; WOX family

WUSCHEL(WUS)相关的同源异型盒(WUSCHEL-related homeobox, WOX)转录因子家族是一类植物特有的转录因子家族。已报道的 WOX 转录因子家族成员具有调控植物干细胞分裂分化动态平衡、植物的胚胎发育和胚后发育等多种生物学功能<sup>[1]</sup>。在真核生物中,广泛存在着同源异型盒(Homeobox, HB)转录因子超家族,其成员含有一段 60~66 个氨基酸组成的同源异型结构域(Homeodomain, HD),WOX 转录因子家族是 HB 转录因子超家族的一个亚家族<sup>[2]</sup>。

在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,WOX 转录因子家族包括 15 个成员(WUS 以及 WOX1~WOX14),功能已知的 WOX 家族成员参与调控茎顶端分生组织(Shoot apical meristem, SAM)、根顶端分生组织(Root apical meristem, RAM)干细胞的功能维持以及组织器官的起始和发育等诸多过程<sup>[3]</sup>。Laux 等<sup>[4]</sup>利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变,通过记录种子萌发后真叶出现的时间,首次鉴定到 *wus* 突变体。研究发现,该突变体种子萌发后长时间没有真叶出现的主要原因是突变体丧失了茎端的生长点。同时,*wus* 突变体发育表现为走走停停(Stop-and-go),生长缓慢,有多个分枝但没有主茎,花数量减少,雌蕊缺失。进一步研究表明,由于 WUS 基因的缺失,干细胞加速分化,并且 WUS 的表达范围为 SAM 的组织中心(Organizing center, OC),因此转录因子 WUS 的功能是维持 SAM 中干细胞的干性、促进干细胞的增殖、维持干细胞数量和抑制干细胞的分化<sup>[5]</sup>。在茎尖分生组织的调控中,WUS 促进干细胞标记基因 *CLV3* 的表达,维持干细胞特性,而 *CLV3* 的表达抑制 WUS 的转录水平,促进干细胞分化<sup>[6,7]</sup>,从而形成了一个非常精确的反馈调节环,控制着茎端分生

组织中干细胞的数目<sup>[8]</sup>。在根顶端分生组织,另一个 WOX 家族成员 *WOX5* 在静止中心(Quiescent centre, QC)表达,*WOX5* 功能是维持 RAM 中干细胞的干性,进一步的实验表明 SAM 组织中心表达 *WOX5* 可以替代 WUS 的作用,反之亦然<sup>[9]</sup>。

WOX 转录因子家族成员广泛参与植物的胚胎及胚后发育调控。在植物胚后发育阶段,各种生物及非生物胁迫能够通过相应的信号转导途径影响干细胞动态平衡调控,继而使植物体相应地调整发育进程以适应环境变化。根尖干细胞动态平衡的建立和维持由两个相对独立的途径进行调控,其一为植物激素生长素和转录因子 PLT<sup>[10]</sup>,其二是 GRAS 家族的 SHR、SCR<sup>[11,12]</sup>。在拟南芥根尖中,与胁迫相关的激素茉莉酸能够负向调控根尖干细胞维持能力和根分生组织活力,其分子机理是参与茉莉酸信号途径的转录因子 MYC2 能够直接结合 *PLT1/2* 的启动子区域并抑制其表达,进而通过影响生长素的梯度分布调控干细胞的动态平衡<sup>[13]</sup>。因此,在逆境胁迫及激素处理条件下对番茄 WOX 基因家族成员表达情况进行分析具有十分重要的理论和实际意义。

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一种重要的蔬菜和经济作物,其生长发育过程能够直接影响其最终的产量和品质<sup>[14]</sup>。顶端分生组织发育是植物生长发育的重要组成部分,番茄顶端分生组织发育的分子机制研究对于番茄的分子育种工作具有重要的指导作用。随着番茄 Heinz 1706 品种基因组的测序工作的完成,番茄中许多基因家族被相继鉴定并完成了相关生物信息分析,如热激蛋白 90<sup>[15]</sup>、PPR 家族<sup>[16]</sup>和 B3 超家族<sup>[17]</sup>等。与番茄发育紧密相关的 CLE 家族<sup>[18]</sup>以及 LRR-RLK 家族<sup>[19]</sup>已经相继被报道,而作

为直接参与茎顶端分生组织发育的 WOX 转录因子家族的鉴定和分析工作还未见报道。本研究利用生物信息学方法,首次对番茄 WOX 转录因子家族在全基因组水平上进行了预测,并对其系统进化、基因表达和 GO 注释进行分析,以期对番茄 WOX 转录因子家族成员的功能分析以及番茄的分子育种提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 番茄 WOX 转录因子家族成员的鉴定及序列分析

根据文献<sup>[20]</sup>报道,利用 TAIR 数据库(<http://www.arabidopsis.org/>),下载拟南芥中 15 个 WOX 转录因子家族成员的蛋白全长序列。利用 MAFFT 对其进行全长序列比对,基于序列比对得到的保守的同源异型结构域(Homeodomain sequences),使用 HMMER 3.0 建立隐马尔科夫模型序列谱(Hidden Markov model profile, HMM profile)。在茄科植物数据库(<http://solgenomics.net/>)下载番茄蛋白序列数据库(Annotation protein database, ITAG v2.3),使用建立的隐马尔科夫模型序列谱对番茄蛋白序列数据库进行检索,限定  $E$  值为 0.01,获得候选序列。针对上一步所获候选序列,利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)和 Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)对候选序列蛋白质结构进行分析,剔除不含完整同源异型结构域的候选序列。利用 ExPASy Proteomics Server(<http://expasy.org/>)对所有预测的番茄 WOX 家族成员蛋白序列进行分子量和等电点的分析。

### 1.2 多序列比对、同源建模及系统发育树重建

利用 MAFFT 在默认参数下,将新预测的番茄以及已报道的拟南芥 WOX 家族成员的蛋白全长序列进行多序列比对。基于文献<sup>[21]</sup>报道,选取保守的同源异型结构域,利用 Texshade 将结果可视化。基于 Swiss-Model 平台对同源异型结构域进行同源建模,利用 PyMol 对其三维结构进行可视化展示。基于同源异型结构域蛋白序列的比对结果,使用 MGEA6.06 构建邻接树(Neighbor-Joining, NJ tree),参数设置为:Bootstrap 检验次数设为 1000 次,并选择 Poisson Model 和 Pairwise Deletion 进行分析。利用同样的比对结果,使用 PhyML 构建极大似然树

(Maximum Likelihood, ML tree),Bootstrap 设为 100 次,并利用 ProtTest 2.4 对同源异型结构域氨基酸序列比对结果进行分析,选择 LG+G 模型构建极大似然树;使用 MrBayes(v3.2.1)构建贝叶斯树(Bayesian inference, BI),同样利用 ProtTest 2.4 选择 LG+G 模型重建贝叶斯树。参照文献<sup>[22]</sup>设置参数,建立 4 个马尔可夫链,以随机树为起始树,共运行 2 500 000 代,每 1000 代进行一次抽样。舍弃 25% 的老化样本,基于剩余样本,构建一致树,并计算相应的后验概率(Posterior probability)。利用 Tree View 1.4.0 显示所有构建的系统发生树。

### 1.3 基因结构和保守基序分析

利用茄科植物数据库(<http://solgenomics.net/>)和 TAIR 数据库,分别下载番茄和拟南芥 WOX 基因家族成员的基因组序列和 CDS 序列,使用 GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)工具分析结果并进行基因结构的可视化展示。利用 Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation(MEME, <http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>)对番茄 WOX 转录因子家族成员的蛋白序列的保守基序(motif)进行分析。

### 1.4 染色体定位及基因同源性分析

利用茄科植物数据库(<http://solgenomics.net/>),提取番茄 WOX 基因家族的染色体定位信息,利用 Perl 程序对染色体定位信息进行分析并将其可视化。利用基因同源关系分析工具 OrthoMCL<sup>[23]</sup>对番茄和拟南芥 WOX 基因家族的基因同源性关系进行分析,利用可视化工具 Circos<sup>[24]</sup>将基因同源性关系进行可视化展示。

### 1.5 基因表达分析及 GO 注释分析

#### 1.5.1 转录组数据的处理与结果分析

利用 NCBI SRA 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)下载转录组测序数据,登录号为 SRA049915。基于 Heinz 1706 转录组测序(RNA-seq)数据,利用 Tophat<sup>[25]</sup>和 Cufflink 等程序分析转录组测序数据并进行表达量计算,提取 WOX 基因家族成员的基因表达数据,将表达数据标准化后,使用 R 语言 pheatmap 程序绘制热图(Heatmap),将表达数据可视化。

1.5.2 芯片数据的处理与结果分析

利用 Genevestigator(<https://www.genevestigator.com/gv/>)番茄基因芯片平台,搜索基因匹配探针,进行基因表达模式和诱导表达分析,数据结果由 Genevestigator 导出后,使用 Illustrator 进行编辑。

1.5.3 番茄苗期的 RNA 提取及反转录

利用 Trizol(Invitrogen)分别提取番茄苗期(20 DAG)的茎尖、茎、叶、根及根尖总 RNA。提取的 RNA 经 DNA 酶消化后,Nanodrop 进行定量,所有组织均使用 2 μg RNA 及 M-MLV(Invitrogen)以 20 μL 体系进行反转录。

1.5.4 qRT-PCR 结果检测

针对在拟南芥干细胞动态平衡调控中发挥重要作用的 *AtWUS* 和 *AtWOX5* 基因,选取番茄中直系同源的 *SIWUS*、*SIWOX5* 基因,对其在苗期不同组织的表达进行实时定量 PCR 分析。使用 Primer Premier 5.0 软件在基因特异性区域设计引物,扩增片段在 150~200 bp,引物序列见表 1,以番茄管家基因 *UBI3*<sup>[26]</sup>作为内参。选取番茄根、根尖、茎、茎尖和叶片共 5 个组织,各个组织分别平行收集 3 组样品作为 3 次生物学重复,每组样品分别提取 RNA 并反转录为 cDNA,定量分析时设计 3 次技术重复,计算其平均值及标准差并根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量,以叶片的相对表达量设定为单位 1。单因素方差分析利用 GraphPad Prism 完成,选择 Tukey 方法进行测试。

1.6 GO 注释分析

使用番茄 WOX 转录因子家族蛋白序列,利用

Blast2GO 在默认参数下进行比对及 GO(Gene Ontology)注释<sup>[27]</sup>,通过 WEGO 工具进一步分析注释结果并进行可视化展示。

2 结果与分析

2.1 番茄 WOX 转录因子家族成员鉴定及序列分析

基于拟南芥 WOX 转录因子家族成员蛋白序列,进行多序列比对获得保守的同源异型结构域(Homeodomain),以此构建隐马尔可夫模型序列谱。利用所构建的隐马尔科夫模型序列谱检索番茄蛋白数据库,人工去除冗余序列,获得候选基因的蛋白序列。通过 SMART 和 Pfam 对候选蛋白序列进行结构域分析,剔除不含完整同源异型结构域的蛋白序列,最终预测得到 10 个番茄 WOX 转录因子家族成员。

为了更好地体现新鉴定的番茄 WOX 转录因子家族成员与拟南芥 WOX 转录因子家族成员的同源关系,基于 Zhang 等<sup>[20]</sup>的命名策略,利用番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族成员蛋白全长序列的比对结果,重建了邻接树,并基于邻接树的进化关系,对新鉴定的番茄 WOX 转录因子家族成员进行命名(表 2)。

对新鉴定的番茄 WOX 转录因子家族成员的理化性质分析发现,各成员之间氨基酸的长度存在一定的差异,在 158~393aa 之间,蛋白分子量则介于 18.67~44.06 kDa 之间,如表 2 所示。家族成员的蛋白理论等电点同样存在一定差异,在 5.35~9.40 之间。

2.2 同源异型结构域的鉴定和分析

基于新鉴定的番茄 WOX 转录因子家族成员蛋白序列,以已报道的 15 条拟南芥 WOX 转录因子家

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物  
Table 1 Primers used for real-time quantitative RT-PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	基因号
<i>SIWOX5</i>	F: ACCTGTTCCGCTCTGGACTC	Solyc03g096300.2.1
	R: CCTTACGACGACGTTTCTGT	
<i>SIWUS</i>	F: AAAAGAAGAGGCTCATTGCT	Solyc02g083950.2.1
	R: TGGACACTGAACACCTGGAT	
<i>UBI3</i>	F: AGGTTGATGACACTGGAAAGGTT	X58253(NCBI ID)
	R: AATCGCCTCCAGCCTTGTTGTA	

表 2 番茄 WOX 转录家族成员特征分析

Table 2 Characteristics of the WOX transcription factor family in *Solanum lycopersicum*

名称	基因号	进化枝	氨基酸数	分子量(Da)	等电点(pI)	内含子数
SIWUS	Solyc02g083950.2.1	现代进化枝	272	31031.1	6.35	2
SIWOX1	Solyc03g118770.2.1	现代进化枝	393	44057.6	6.68	3
SIWOX2	Solyc06g076000.1.1	现代进化枝	240	26840.0	8.61	1
SIWOX3a	Solyc11g072790.1.1	现代进化枝	209	24032.4	8.77	1
SIWOX3b	Solyc11g072770.1.1	现代进化枝	197	22760.1	9.40	0
SIWOX4	Solyc04g078650.2.1	现代进化枝	242	27686.0	8.69	2
SIWOX5	Solyc03g096300.2.1	现代进化枝	158	18665.9	6.32	1
SIWOX9	Solyc02g077390.1.1	中间进化枝	358	40145.4	7.02	2
SIWOX11	Solyc06g072890.1.1	中间进化枝	264	29126.7	5.38	2
SIWOX13	Solyc02g082670.2.1	古老进化枝	274	30745.3	5.53	2

族成员蛋白序列为参考，使用 MAFFT 在默认参数下进行多序列比对，发现所有番茄 WOX 转录因子家族成员均含保守的同源异型结构域。基于文献<sup>[1,21]</sup>报道，选取保守的同源异型结构域，利用 Texshade 将结果可视化(图 1A)。分析发现，番茄和拟南芥的同源异型结构域的结构高度相似，含 60 个氨基酸残基(SIWUS 和 AtWUS 同源异型结构域含有 61 个氨基酸残基)组成的 helix-loop-helix-turn-helix 结构<sup>[1]</sup>。已有研究<sup>[20]</sup>报道了 11 个同源异型结构域中保守的位点，包括 helix1 中的 Q、L 和 Y 以及 helix3 中 I、V、W、F、N、K 和 R 等，这些位点在番茄 WOX 转录因子家族成员蛋白中同样保守，提示这些氨基酸残基可能在番茄 WOX 转录因子家族成员的功能行使中起重要作用<sup>[20]</sup>。值得注意的是，相比于番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族的其他成员，SIWUS 和 AtWUS 在其同源异型结构域中多出了 1 个 Y 残基。参考已有研究<sup>[20]</sup>发现，包括拟南芥 AtWUS 在内，水稻 OsWUS、玉米 ZmWUS1 和 ZmWUS2、高粱 SbWUS 以及杨树 PtWUS 其同源异型结构域均由 61 个氨基酸残基组成，经多序列比对后发现其多出 1 个 Y 残基，这说明 WUS 亚家族的分化时间很可能要早于这些物种的分化时间，同时说明该残基可能对 WUS 转录因子功能执行方面起着重要的作用。利用 Swiss-Model 对 SIWUS 的同源异型结构域进行同源建模，利用 PyMol 对其三维结构进行可视化展示，发现其由 61 个氨基酸残基组成的同源结构域依然为 helix-loop-helix-turn-helix 结构(图 1B)，多出的 Y

残基位于 Helix1 和 Loop 之间。已有研究表明拟南芥中 WOX5 可以替代 WUS 在茎顶端分生组织中维持干细胞的动态平衡，缺少 Helix1 和 Loop 之间的 Y 残基的 AtWOX5 似乎可以替代有 Y 残基的 AtWUS，在茎尖执行相关功能<sup>[9]</sup>。多出的 Y 残基功能尚无相关文献报道，本课题组后续将进行 Y 残基点突变等分子生物学实验阐述其具体的生物学功能。

2.3 系统发育分析

为了进一步揭示番茄 WOX 转录因子家族的进化关系，以拟南芥 WOX 转录因子家族成员为参考，对新鉴定的番茄 WOX 转录因子家族成员同源异型结构域氨基酸序列进行多序列比对。基于比对结果，利用 MEGA、PhyML 和 MrBayes 分别构建了邻接树、极大似然树和贝叶斯树，三者具有高度相似的拓扑结构，表明重建的系统发育树是可靠的。

基于重建的邻接树(图 2)，番茄 WOX 转录因子家族和做为参考的拟南芥 WOX 转录因子家族共 25 个成员被分为 3 个进化支(Clade)和 9 个亚家族(Subgroup)。现代进化支(Modern clade)包含了 WUS、WOX1、WOX2、WOX3、WOX4 和 WOX5，共 6 个亚家族；中间进化支(Intermediate clade)包含了 WOX9 和 WOX11 两个亚家族；古老进化支(Ancient clade)包含了 WOX13 一个亚家族，这与以往的研究结果相一致<sup>[20~22]</sup>。每一个亚家族都包含了番茄和拟南芥中至少一个 WOX 家族成员，这说明 WOX 家族的分化时间早于番茄和拟南芥的物种分化时间。

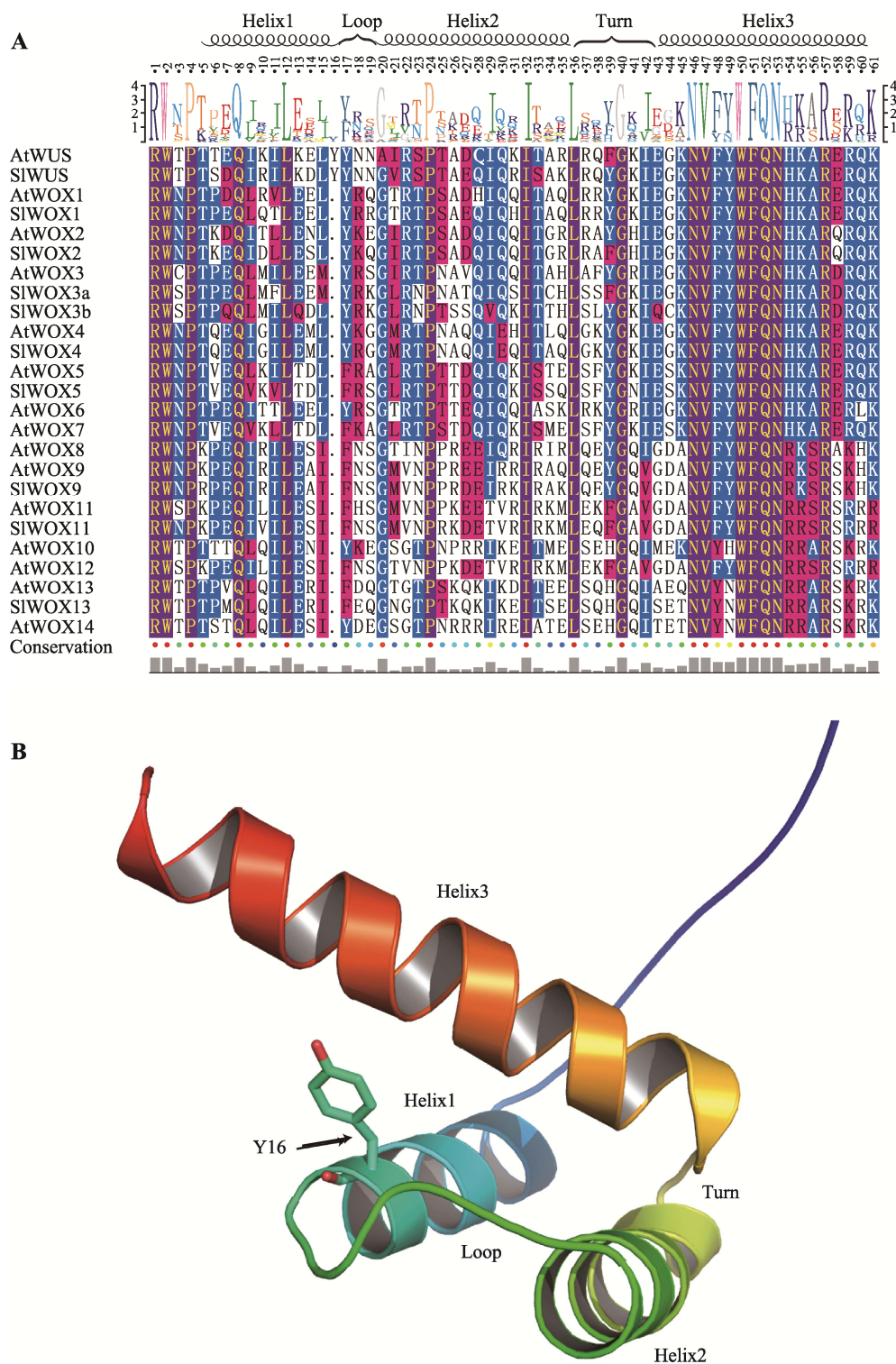


图 1 番茄 WOX 转录因子家族蛋白同源异型结构域分析

**Fig. 1 Conserved homeodomain analysis of WOX family members in *S. lycopersicum***

A: 多序列比对分析。多序列比对利用 MAFFT 在默认参数下完成, 使用 TexShade 将比对结果可视化。完全保守的氨基酸残基用紫色标注, 其余的相对保守的氨基酸残基用蓝色、红色标注, 不同位点氨基酸符号堆叠高度表明该位点相应氨基酸残基的保守程度。B: SIWUS 的三维结构分析。基于 Swiss-Model 平台对 SIWUS 同源异型结构域进行同源建模, 利用 PyMol 对进行可视化展示。相较其他 WOX 转录因子 SIWUS 多出的 Y16 残基位于 helix1 和 loop 之间, 在 PyMol 中将其设为棍棒模型(Show as sticks)以突出显示。

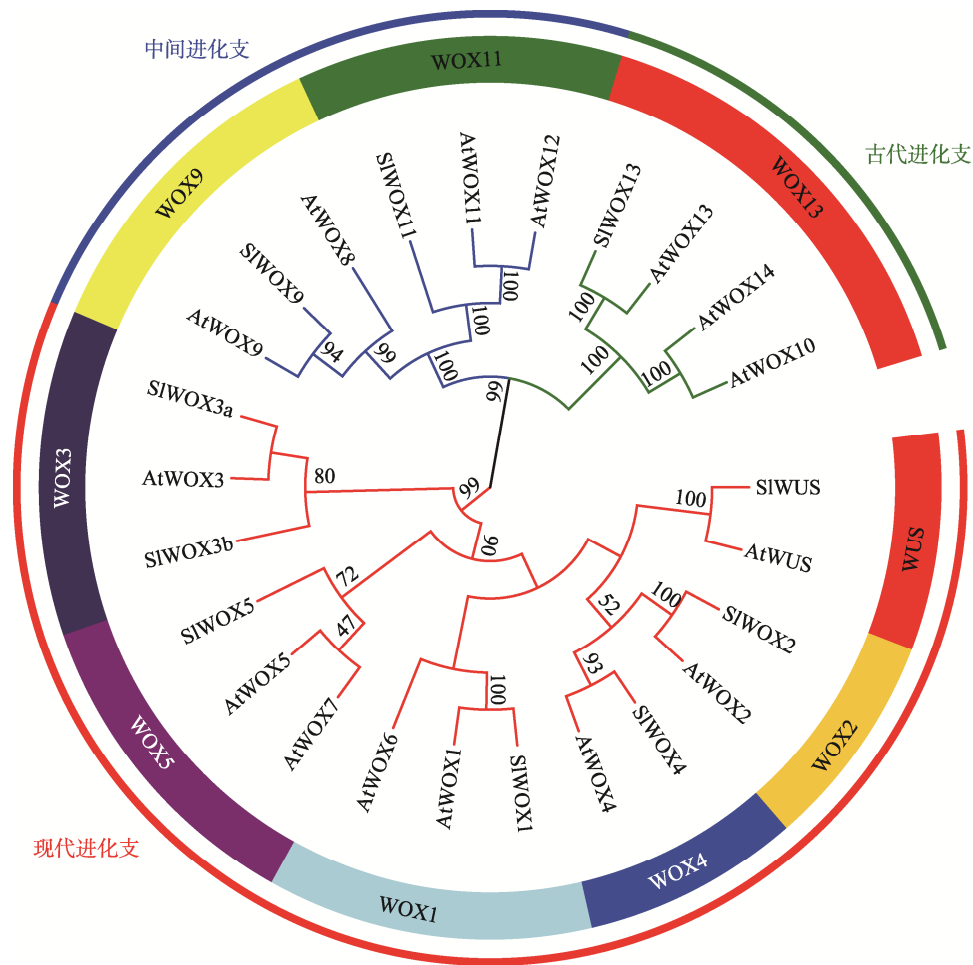


图 2 番茄 WOX 转录因子家族的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of WOX family genes in *S. lycopersicum*

系统进化树采用邻接法, 基于 MAFFT 默认参数下多序列比对结果, 利用 MEGA6.06 构建, Bootstrap 检验次数设为 1000 次, 并选择 Poisson Model 进行分析。番茄、拟南芥 WOX 转录因子家族 25 个成员被分为 3 个进化支和 9 个亚家族。

进一步比较分析表明, 在不同亚家族中, 番茄 WOX 家族成员与拟南芥 WOX 家族成员在数目上差异较大, 说明在番茄和拟南芥物种分化后, WOX 家族的各个亚家族可能经历了不同的进化事件。

#### 2.4 番茄 WOX 基因家族的基因结构分析

利用 GSDS 构建了番茄 WOX 基因家族成员的基因内含子-外显子结构图。基于同源异型结构域氨基酸序列的同源比对结果, 利用 PhyML 构建极大似然树<sup>[28]</sup>来反映番茄 WOX 家族成员以及拟南芥 WOX 家族成员之间的进化关系, 所构建的极大似然树与邻接树有着十分类似的拓扑结构(图 3)。

基因结构分析表明, 同一亚家族中内含子数目较为保守, 而不同亚家族之间的成员内含子数目存

在差异, 最少的没有内含子而最多的有 3 个内含子。WOX9 亚家族的大部分成员含有 3 个内含子; WOX3 和 WOX5 亚家族大部分成员仅含有 1 个内含子。进一步分析发现, 同一亚家族内, 番茄与拟南芥直系同源的 WOX 基因, 其外显子、内含子的组织结构高度相似。因为基因家族成员间基因结构的变化也能反映出基因家族成员之间的进化关系, 所以同一亚家族内高度相似的外显子、内含子的组织结构说明了所重建的系统发育树的可靠性。同时这也侧面反映了 WOX 基因家族成员的分化时间要早于番茄和拟南芥物种的分化时间。

#### 2.5 番茄 WOX 转录因子家族的蛋白保守基序分析

为了进一步鉴定、分析 WOX 转录因子家族的



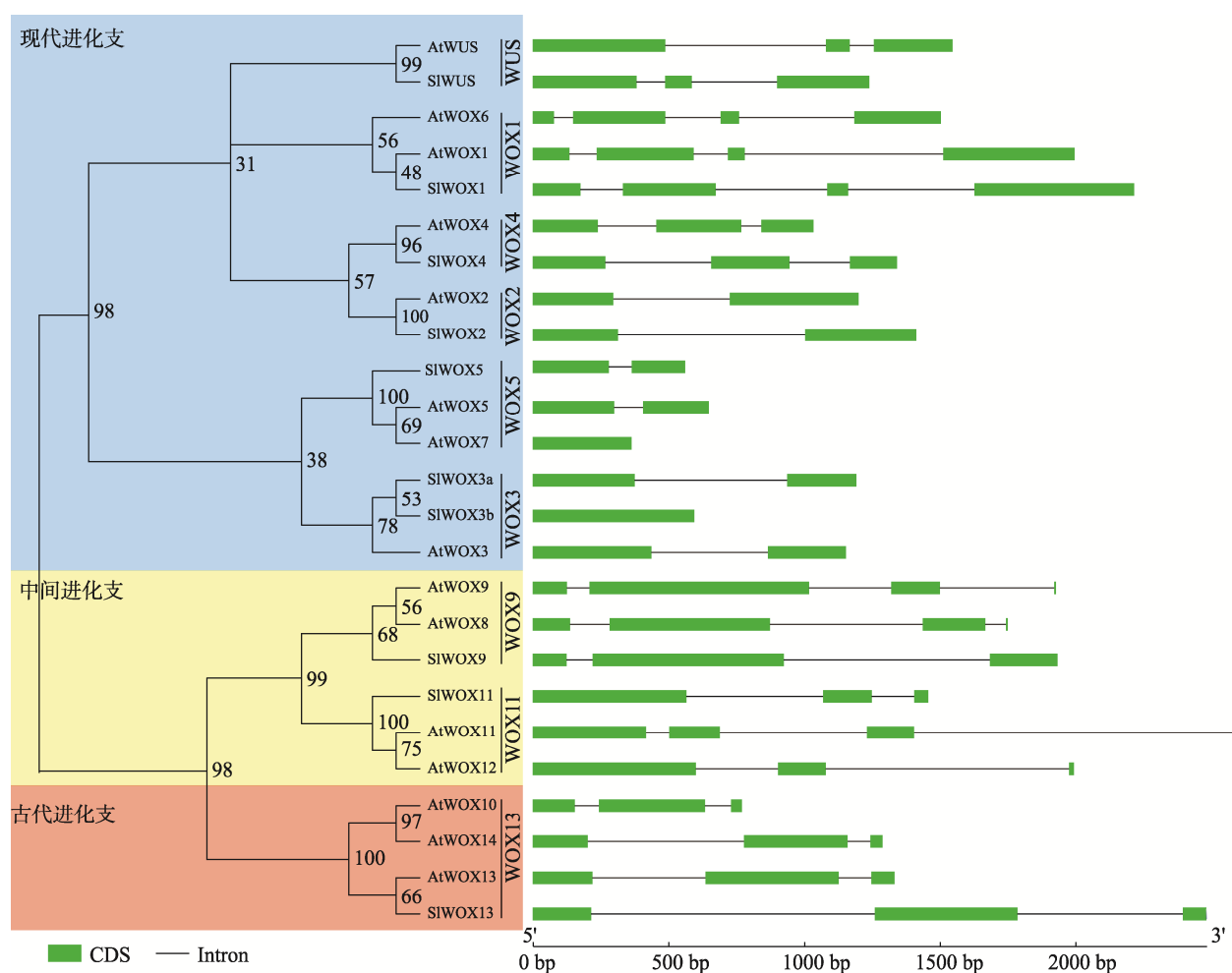


图 3 番茄 WOX 转录因子家族极大似然系统发育树及基因结构

Fig. 3 Maximum-Likelihood tree and gene structure of WOX family members in *S. lycopersicum*

系统进化树采用极大似然法, 基于 MAFFT 默认参数下多序列比对结果, 利用 PhyML 构建, Bootstrap 检验次数设为 100 次, 并选择 LG+G 模型分析。通过比对番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族成员的基因组序列和 CDS 序列, 使用 GSDS 工具分析进行基因结构的可视化展示。绿色方框表示外显子, 灰色实线表示内含子。

基序, 利用序列保守基序识别工具 MEME, 对新鉴定的番茄 WOX 转录因子的蛋白序列的保守基序进行分析(图 4)。

结果表明, 所有番茄 WOX 转录因子家族成员都含有由 60 个氨基酸残基组成的同源异型结构域 (Motif 1)。基于同源异型结构域氨基酸序列的同源比对结果, 利用 MrBayes 构建贝叶斯树<sup>[29]</sup>来反映成员之间的进化关系, 所构建的贝叶斯树与邻接树、极大似然树有着十分类似的拓扑结构。在现代进化支内的 WOX 转录因子家族成员除了同源异型结构域外, Motif3 在绝大多数成员中也是保守的, 进一步分析发现其和 WUS box 的序列一致。而中间进化支的所有成员在其蛋白序列的 C 端均存在串联的

Motif2 和 Motif4。总之, 同一亚家族内的 WOX 转录因子家族成员的保守基序的种类、数目和组织形式具有很强的 consistency, 同样从侧面反映了系统发育分析的可靠性。

## 2.6 染色体定位和同源性关系分析

为进一步分析番茄与拟南芥 WOX 家族成员的进化关系, 基于番茄基因组中的注释信息, 进行了番茄 WOX 基因的染色体定位分析, 并利用 Perl 程序将结果可视化。番茄 WOX 基因在其基因组的 12 条染色体上的分布并不均匀, 2、3、4、6、11 号染色体分布有 WOX 基因, 其余染色体上未检测到 WOX 基因; 番茄第 2 号染色体上 WOX 基因分布最多, 有



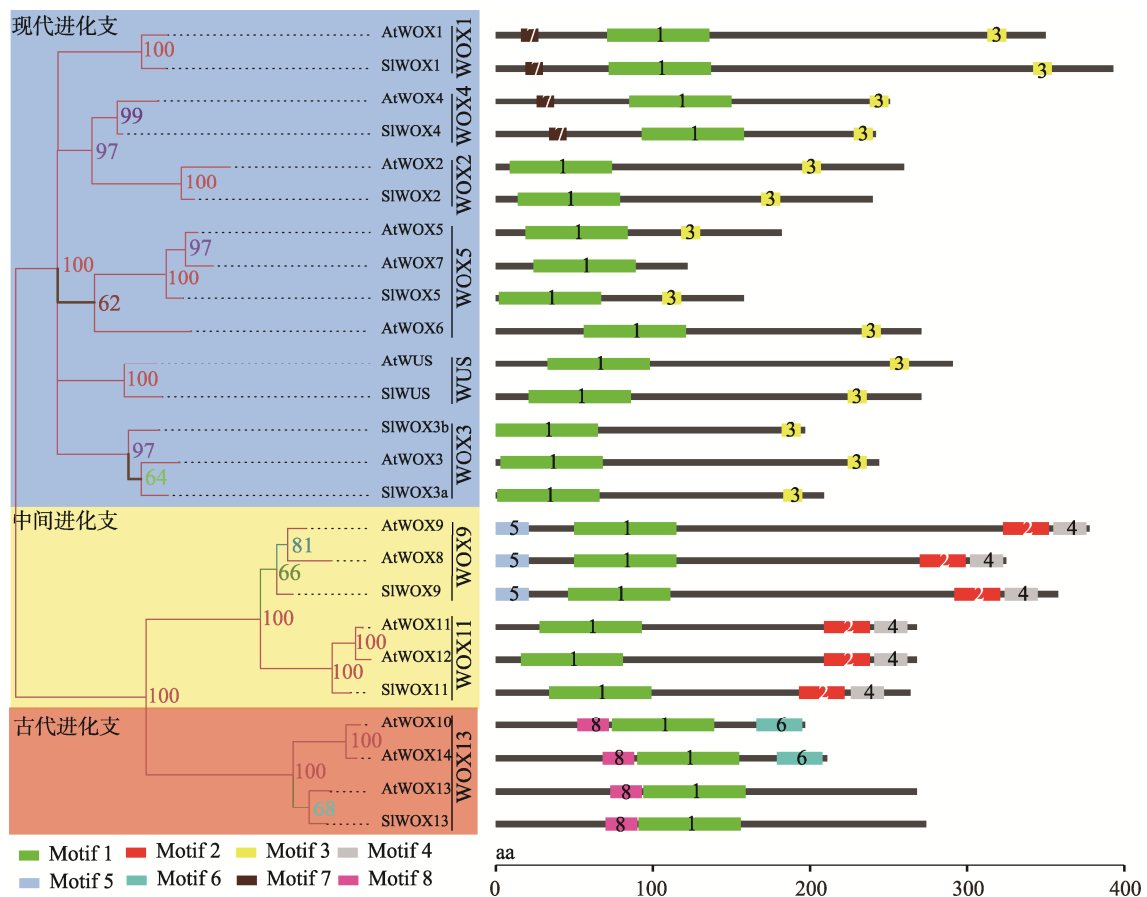


图 4 番茄 WOX 转录因子家族蛋白保守结构域分析

Fig. 4 Conserved motifs within different subgroups of WOX family members in *S. lycopersicum*

系统进化树采用贝叶斯法,基于 MAFFT 默认参数下多序列比对结果,利用 PhyML 构建,选择 LG+G 模型分析建立 4 个马尔可夫链,以随机树为起始树,共运行 2 500 000 代,每 1000 代抽样一次,舍弃 25% 的老化样本,基于剩余样本构建一致树,并计算相应的后验概率。番茄 WOX 转录因子家族成员的保守基序利用 MEME 进行分析,彩色方框表示保守基序。

3 个,分别是 *SIWUS*、*SIWOX9*、*SIWOX13*(图 5)。同一家族的不同成员如果位于同一个或相邻的基因间区域,则这些成员为串联重复关系<sup>[30]</sup>。因此,番茄 WOX 基因家族的 *SIWOX3a* 和 *SIWOX3b* 形成了 1 个串联重复对。

利用 Orthomcl 进行同源关系分析,并利用 Circos 将结果可视化。结果显示,番茄和拟南芥的成员之间有着很强的直系同源关系,番茄 WOX 家族的每个亚家族中都至少有 1 个成员与拟南芥 WOX 家族中相应的成员存在直系同源关系,例如 *AtWUS* 和 *SIWUS*,暗示了 WOX 家族成员的分化时间可能在番茄和拟南芥物种分化时间之前。进一步分析发现,串联重复的 *SIWOX3a* 和 *SIWOX3b* 所编码的蛋白为旁系同源,说明这两个基因来源于一次复制事件。

## 2.7 番茄 WOX 转录因子家族的蛋白功能域分析

根据文献<sup>[1,20]</sup>报道,拟南芥 WOX 转录因子家族中蛋白功能域主要有 3 个:WUS 盒(WUS box)、类 EAR 基序(EAR-like motif)和酸性区域(The acidic region),其中 WUS box(TLXLFP, X 可以是任意氨基酸)是现代进化支中的成员所特有的。

通过序列比对分析发现,在番茄 WOX 转录因子家族现代进化支的 7 个成员 *SIWUS*、*SIWOX1*、*SIWOX2*、*SIWOX3a*、*SIWOX3b*、*SIWOX4* 和 *SIWOX5* 中均含有保守的 WUS box(图 6A)。拟南芥 WOX 转录因子家族中,WUS 和 WOX5 亚家族的成员在其 C 端含有 1 个保守的 EAR-like 基序(EAR-like motif, 图 6B),其主要功能是抑制下游基因表达<sup>[1]</sup>。进一步

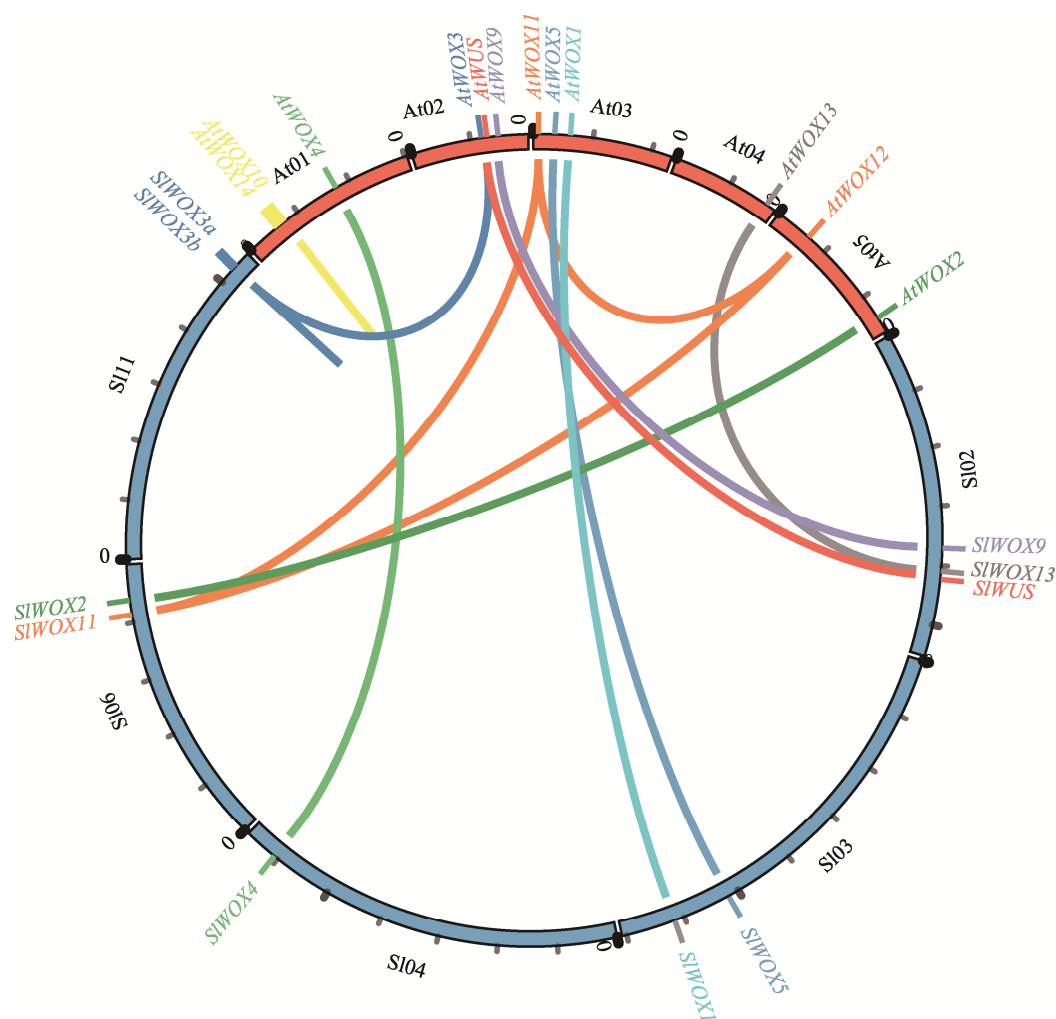


图 5 番茄 WOX 家族成员的染色体定位及同源关系分析

Fig. 5 Chromosomal distribution and homologous members of the WOX family in *S. lycopersicum*

利用 OrthoMcl 对番茄和拟南芥 WOX 基因家族的基因同源性关系进行分析, 利用 Circos 将基因染色体定位和同源性关系进行可视化展示。番茄染色体(SI02、SI03 等)和拟南芥染色体(At01~At05)分别用蓝色和红色标示, 具备同源关系的 WOX 基因用彩色连线来显示。

的分析发现, 在番茄 SIWUS 和 SIWOX5 的 C 端同样含有保守的 EAR-like 基序, 提示番茄中 SIWUS 和 SIWOX5 可能与拟南芥同源的 AtWUS、AtWOX5 有着相似的作用。有意思的是, 番茄 SIWUS 和拟南芥 AtWUS 的酸性区域似乎并不保守(图 6C), 但二者似乎均含有保守的 LXXXQEEE 基序。

## 2.8 番茄 WOX 基因家族的基因表达分析

基于番茄转录组测序(RNA-seq)数据, 分析并提取 WOX 基因家族成员的基因表达数据, 使用 R 语言将表达数据标准化和可视化。从图 7 中可以看出, WOX 基因家族成员在根、根尖、叶、茎、茎尖等组

织中均有表达。进一步的分析发现, 不同亚家族内 WOX 基因的表达具有一定的特异性, 在 WOX13 亚家族内, 绝大多数成员在 5 个组织中有较高的表达量, 表明这些基因在植物的发育过程中均起重要作用。同一亚家族的 WOX 基因在不同组织中的表达差异较为明显, WUS 亚家族的 SIWUS 和 AtWUS 在茎尖的表达水平要高于茎以及其他组织, 与其在茎顶端分生干细胞动态平衡调控的功能是相关的; 同时 WOX5 亚家族的 SIWOX5 和 AtWOX5 在根中表达量较高, 这与拟南芥中同源基因的研究结果相一致<sup>[31]</sup>。进一步的分析发现, 同一亚家族的 WOX 基因在同一组织中的表达具有差异, 在 WOX3 亚家族内, SIWOX3a

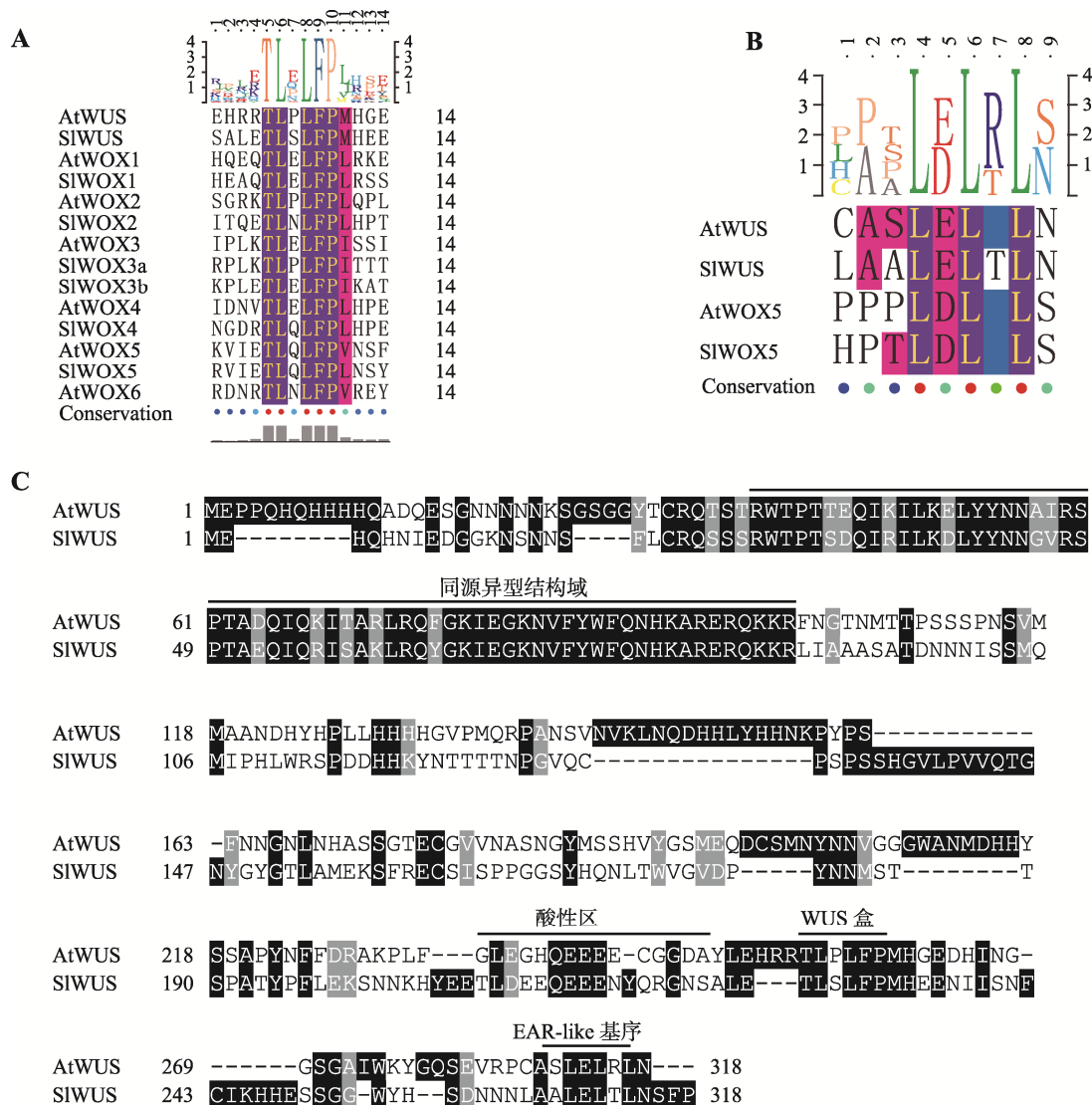


图 6 番茄 WOX 转录因子家族功能结构域分析

Fig. 6 Functional domain analysis of WOX transcription factors in *S. lycopersicum*

A: WUS box 序列比对结果。WUS box 的保守基序序列为 TLXLFP, 完全保守的氨基酸残基用紫色标注; B: 类 EAR 基序序列比对结果。类 EAR 基序序列为 LXLXLX, 完全保守的氨基酸残基用紫色标注, 其余的相对保守的氨基酸残基用蓝色、红色标注。C: 酸性区域比对结果。SlWUS 和 AtWUS 氨基酸全长序列比对, 利用 MAFFT 在默认参数下完成, 黑色、灰色阴影表示保守的氨基酸残基; SlWUS 和 AtWUS 酸性区中包含保守的 LXXXQEEE 核心基序。

和 *SlWOX3b* 的表达规律总体是相似的, 但是在茎尖组织中 *SlWOX3b* 的表达水平要显著高于 *SlWOX3a*, 这表明来源于复制事件的两个基因在茎尖部位所行使的功能可能发生了变化。

番茄的果实发育过程对于番茄的风味、硬度以及果实产量等众多农艺性状十分重要, 通过分析 WOX 基因家族成员在果实发育成熟过程中基因表达情况, 发现不同亚家族的成员在果实成熟中的表

达情况差异较大。如图 8 所示, *SlWOX13* 在果实发育的早期和晚期始终有着较高的表达水平。*SlWUS*、*SlWOX2* 和 *SlWOX5* 在番茄果实发育过程中表达量很低, 而 *SlWOX1*、*SlWOX4* 和 *SlWOX11* 在果实发育的初期表达量较高, 随后逐渐降低, 直到 MG 时期表达终止, 说明这两个基因可能参与了番茄果实早期的发育过程。在 WOX3 亚家族中, *SlWOX3a* 和 *SlWOX3b* 可能是来源于基因的复制事件, 但是二者在

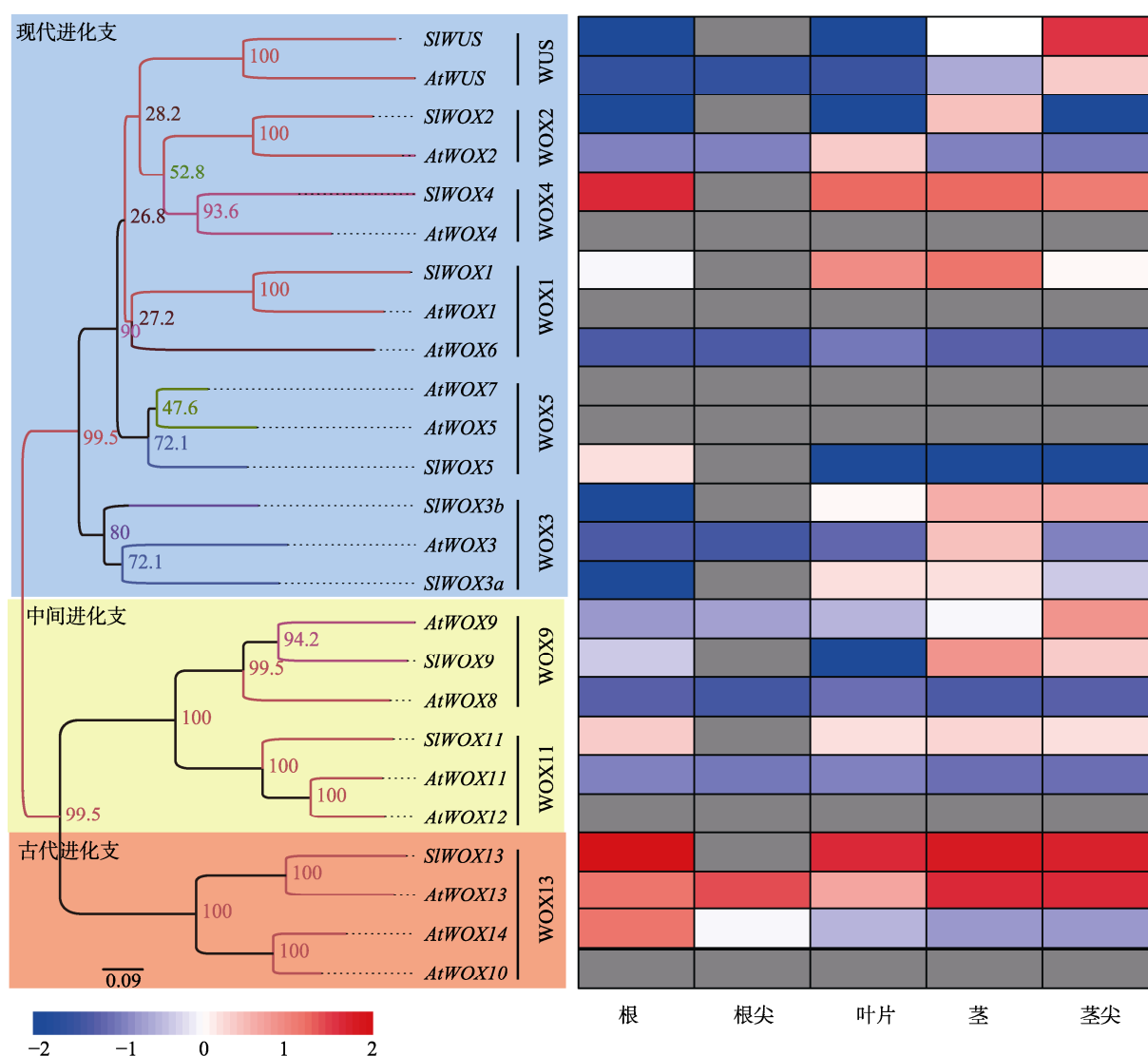


图 7 番茄 WOX 基因家族成员表达模式分析

Fig. 7 Expression patterns of the WOX gene family members in *S. lycopersicum*

系统进化树采用邻接法, 基于 MAFFT 默认参数下多序列比对结果, 利用 MEGA6.06 构建, 选择 Poisson Model, Bootstrap 检验次数设为 1000 次。番茄和拟南芥 WOX 基因表达数据分别来自转录组和芯片数据, 使用 R 语言将表达数据标准化后, pheatmap 程序绘制热图将表达数据可视化。红色越深, 表达量越高; 蓝色越深, 表达量越低, 灰色表示没有相关数据。

果实成熟发育过程中的表达规律出现差异, *SIWOX3a* 在番茄果实发育过程中表达量始终很低, 而 *SIWOX3b* 在 1 cm 果实时期和 2 cm 果实时期有着较高的表达丰度, 说明这二者在果实发育过程中可能有着不同的功能。

基于 Genevestigator 平台的番茄芯片数据库, 本文搜索到 3 个基因有相应的探针匹配, 分别是 *SIWUS* (Soly02g083950.2)、*SIWOX4* (Soly04g078650.2) 和 *SIWOX13* (Soly02g082670.2), 继而分析了 WOX 基

因在盐胁迫 (200 mmol/L NaCl)、7 d 干旱胁迫、高温胁迫及 ABA 处理 4 个不同诱导条件下的表达模式。结果表明, 在 4 个诱导处理条件下 (图 9), *SIWUS* 的表达变化不明显, 表明 *SIWUS* 表达在盐胁迫、干旱胁迫、高温胁迫及 ABA 处理条件下均保持着相对稳定的状态; 在高温处理 1 h 后, *SIWOX4* 的表达出现了略微的下调, 提示高温胁迫可能通过相应的信号转导途径抑制了 *SIWOX4* 的表达; *SIWOX13* 在 7 d 干旱处理条件下出现了明显的上调, 而在 ABA 处理

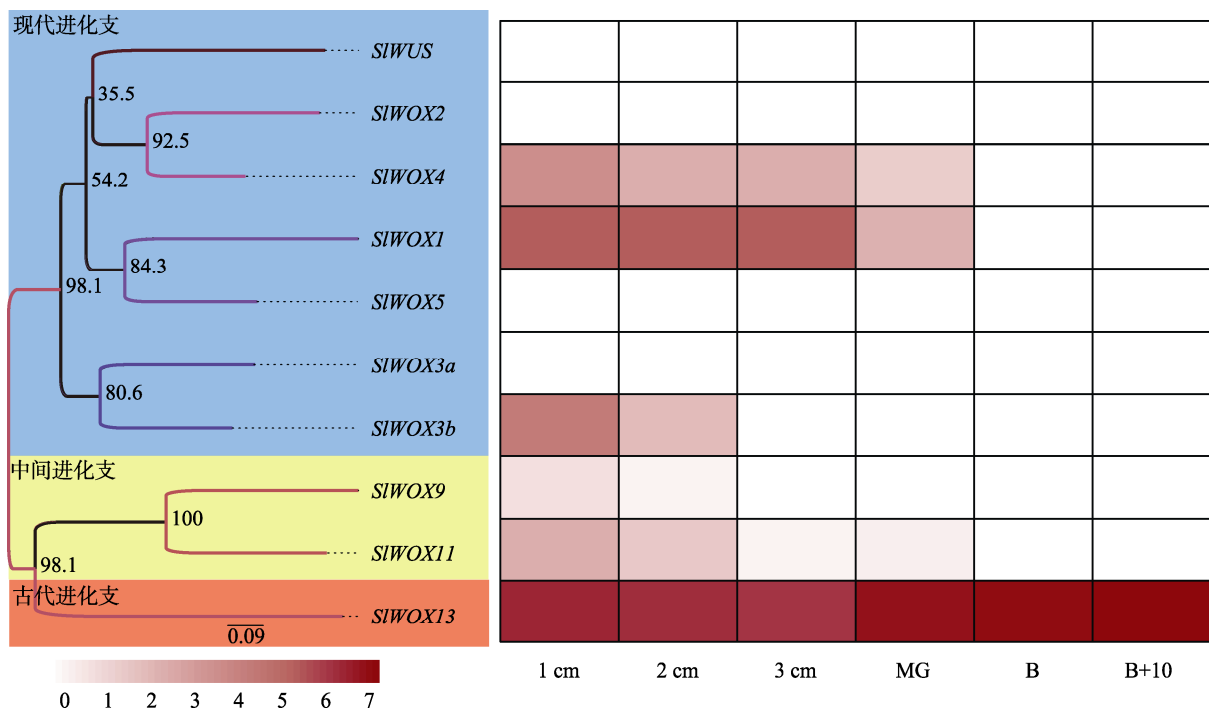


图 8 番茄 WOX 基因家族成员果实成熟过程中表达分析

Fig. 8 Expression patterns of the SIWOX gene family members during tomato ripening

系统进化树采用邻接法构建,选择 Poisson Model, Bootstrap 检验次数设为 1000 次。番茄果实中 WOX 基因表达数据来自转录组数据,使用 R 语言将表达数据标准化后,heatmap 包绘制热图将表达数据可视化。红色越深,表达量越高;红色越淡,表达量越低。1 cm: 1 cm 果实时期; 2 cm: 2 cm 果实时期; 3 cm: 3 cm 果实时期; MG: mature green(绿熟期); B: breaker, early ripening stage(成熟早期); B+10: 10 days post B, red ripe stage(成熟期)。

条件下 *SIWOX13* 表达量并没有出现明显的变化,说明 *SIWOX13* 对干旱胁迫的响应可能受 ABA 以外的其他途径来调控。在拟南芥中 *AtWOX13* 被报道参与根的发育<sup>[32]</sup>,这表明番茄可能通过调节 *SIWOX13* 在根中的表达水平来调控根器官的胚后发育进程来响应干旱环境。

在番茄中选取与拟南芥中分别参与茎顶端分生组织和根顶端分生组织干细胞动态平衡调控的 *AtWUS* 和 *AtWOX5* 的直系同源转录因子 *SIWUS* 和 *SIWOX5*, 对其编码基因进行进一步的表达验证分析,结果如图 10 所示。*SIWOX5* 基因主要在根尖表达,单因素方差分析表明,其在根尖表达量与其他组织均存在显著差异( $P < 0.0001$ );基因 *SIWUS* 则在茎尖的表达量较高,类似的,*SIWUS* 基因在茎尖表达量与其他组织也存在显著差异( $P < 0.0001$ )。

## 2.9 番茄 WOX 转录因子家族 GO 注释分析

进一步对番茄和拟南芥 WOX 家族成员的蛋白

序列进行 GO 注释(图 11),分析发现番茄 WOX 转录因子家族成员的细胞组成(Cellular component)、分子功能(Molecular function)以及其所参与的生物学过程(Biological process)与拟南芥 WOX 转录因子家族成员相似。通过 GO 注释结果分析发现,在细胞组成和分子功能方面,所有番茄的 WOX 转录因子家族成员在细胞核中发挥 DNA 结合和调节转录活性相关的功能,这与 WOX 转录因子的功能相一致;在细胞生物学过程方面,WOX 转录因子家族成员的注释信息呈多样化,所有的番茄 WOX 蛋白均被注释为参与到胚胎等组织器官发育过程中,大部分家族成员还参与细胞间通讯等信号转导过程中,一些家族成员还参与细胞分裂素的响应等过程中,这与已有的文献<sup>[3]</sup>报道相符。

## 3 讨论

WOX 基因家族所编码的植物特异性的转录因子广泛参与植物干细胞的动态平衡调控、胚胎发育、

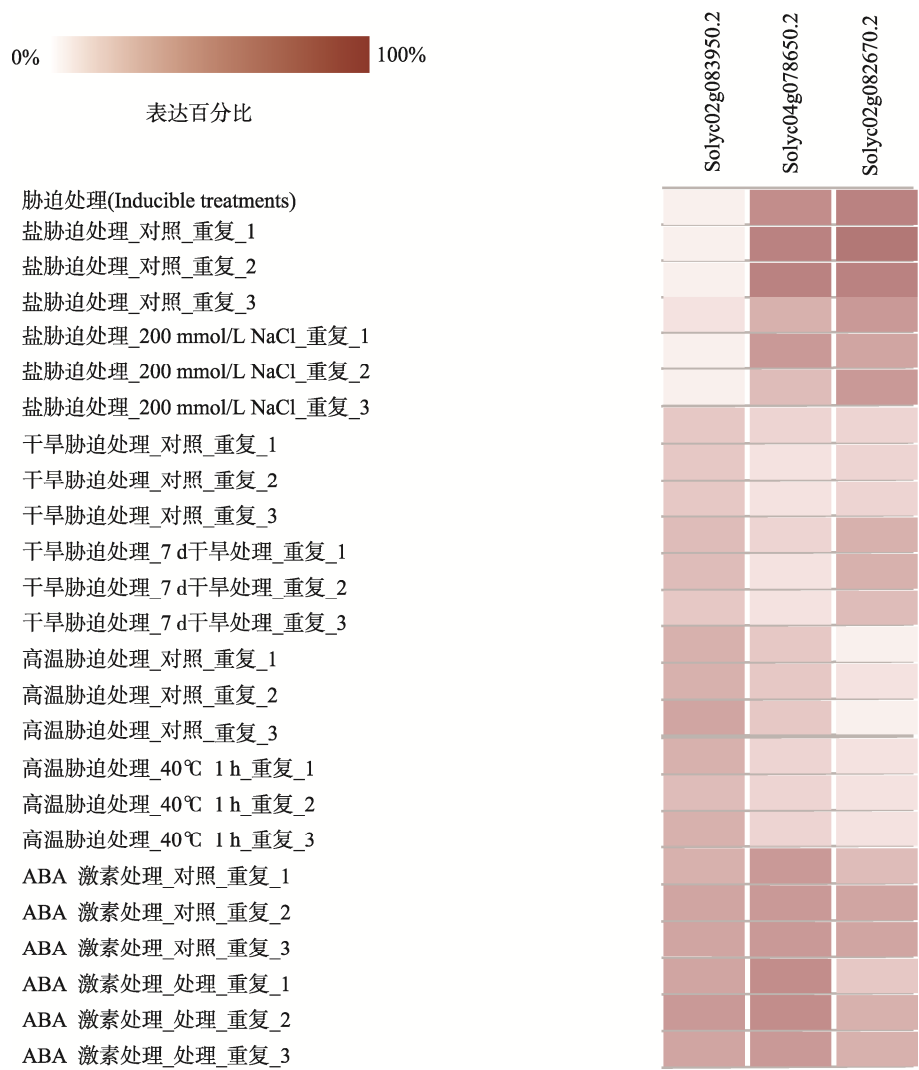


图 9 番茄 WOX 基因家族成员在不同诱导条件下表达分析

**Fig. 9 Expression profiles of the SlWOX gene family under different inducible treatments**

番茄胁迫条件下 WOX 基因表达数据来自 Genevestigator 平台的番茄芯片数据库，红色越深，表达量越高，红色越淡，表达量越低。

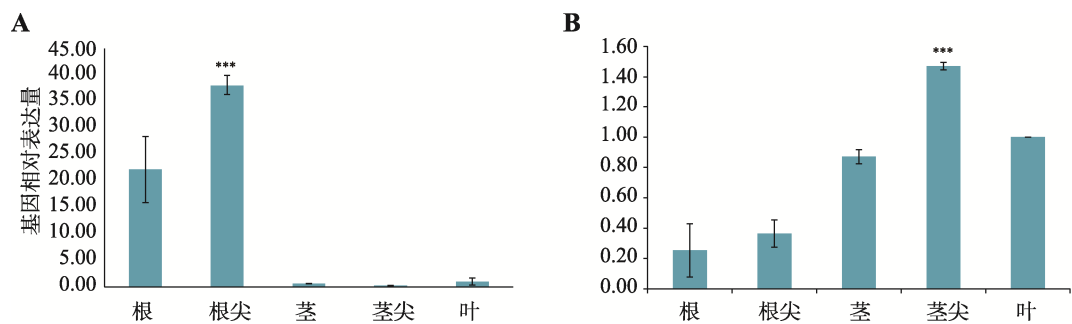


图 10 *SlWOX5*、*SlWUS* 基因 qRT-PCR 表达分析

**Fig. 10 qRT-PCR analysis of *SlWOX5* and *SlWUS***

A :*SlWOX5* 基因的表达模式。\*\*\* 表示单因素方差分析表明 *SlWOX5* 在根尖的表达量与其他组织均存在显著差异  $P<0.0001$  ;B :*SlWUS* 基因的表达模式。\*\*\* 表示单因素方差分析表明 *SlWUS* 在茎尖的表达量与其他组织存在显著差异  $P<0.0001$ 。



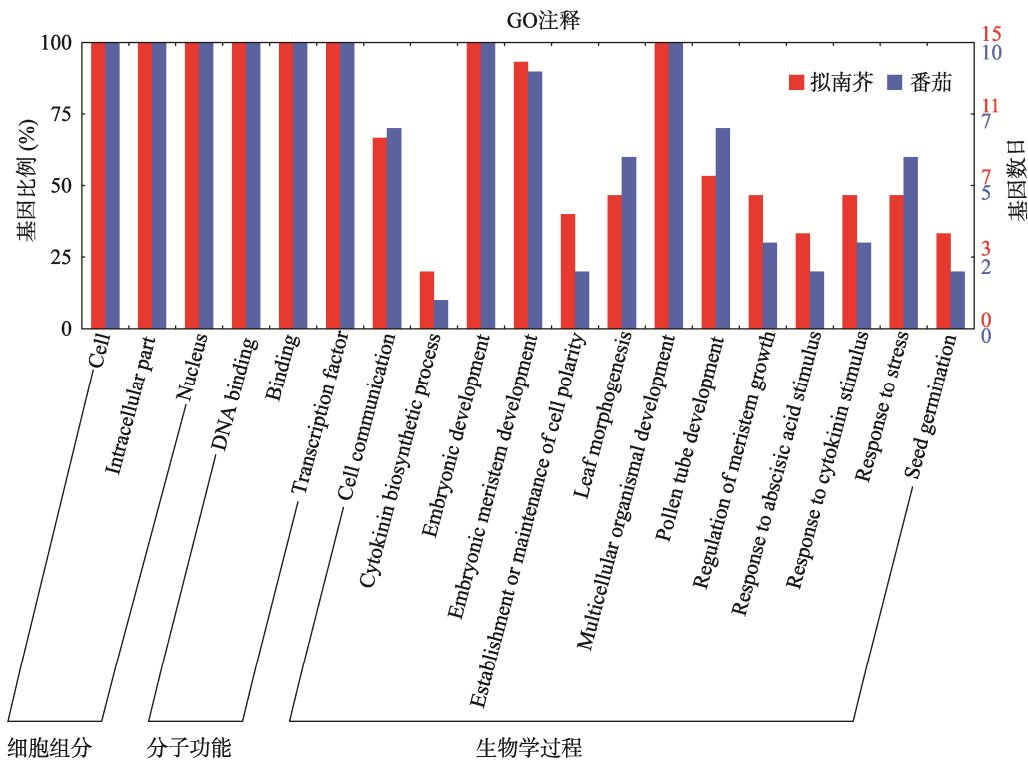


图 11 番茄 WOX 家族成员 GO 注释

Fig. 11 GO analysis of WOX transcription factor family members in *S. lycopersicum*

使用 Blast2GO 在默认参数下进行比对并进行 GO 注释, 通过 WEGO 工具进一步分析注释结果并进行可视化展示, 分析比较番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族成员在细胞组分、分子功能和生物学过程等方面的注释情况。

组织器官的发生和形成等诸多重要的生命过程, 具有十分重要的生物学功能。本研究利用生物信息学方法, 首次从番茄基因组中鉴定出 10 个 WOX 转录因子家族成员, 所有番茄 WOX 转录因子家族成员均含 60 个氨基酸残基组成的保守的同源异型结构域, 番茄和拟南芥的 WOX 转录因子家族成员的同源异型结构域高度保守, 此外 SIWUS 和 AtWUS 在 loop 结构中均多出 1 个 Y 残基, 其具体的功能尚不明确; 针对番茄 WOX 转录因子家族成员, 通过邻接法、极大似然法和贝叶斯法重建的系统发育树具有高度相似的拓扑结构; 系统发育分析表明番茄和拟南芥的 WOX 转录因子家族成员被分成了 3 个亚支, 并进一步被分为 9 个亚家族, 其中每个亚家族都包含了至少 1 个的有直系同源关系的番茄和拟南芥 WOX 转录因子家族成员, 这说明 WOX 转录因子家族成员的分化形成可能早于番茄和拟南芥的物种分化; 通过对番茄和拟南芥 WOX 基因的结构特征分析发现, 不同亚家族中番茄和拟南芥的 WOX 基

因之间内含子数目差异较大, 但是同一亚家族内的番茄与拟南芥 WOX 基因, 其基因结构高度相似, 这同样说明了 WOX 基因家族成员的分化形成可能要早于番茄和拟南芥的物种分化; 通过对 WOX 转录因子家族成员结构域的分析发现, 同一亚家族内的 WOX 转录因子家族成员的保守结构域的组织形式非常类似, 从侧面反映了系统发育分析的可靠性; 此外, 通过染色体定位分析和基因同源关系分析发现 SIWOX3a 和 SIWOX3b 发生于一次串联重复事件; 通过对家族基因的表达分析发现, SIWOX 基因的表达具有一定的组织特异性, SIWOX5 在根尖、根特异表达, SIWUS 在茎尖表达量较高; 番茄果实成熟过程中, 家族不同基因表达情况差异明显, SIWOX13 在果实发育的整个时期表达量始终保持较高的水平, 而 SIWOX1、SIWOX4 和 SIWOX11 表达水平随着发育进程不断降低。同时在串联重复的 SIWOX3a 和 SIWOX3b 在果实成熟发育过程中的表达出现差异, SIWOX3a 在番茄果实发育过程中表达量始终很低,



而 *SIWOX3b* 在 1 cm 果实时期和 2 cm 果实时期有着较高的表达丰度, 这说明来自复制事件的两个基因在果实发育过程中可能出现了功能分化; 番茄诱导胁迫分析发现, *SIWOX13* 在 7 d 干旱处理条件下出现了明显的上调, 其可能通过调节 *SIWOX13* 在根中的表达水平来调控根等胚后发育进程来响应干旱逆境。在番茄中生长素、茉莉酸等其他激素调控 WOX 转录因子的模式和机制仍需后续的分子生物学实验来验证; 基因本体论 GO 注释表明, 番茄和拟南芥 WOX 家族成员作为核定位的转录因子参与至胚胎等组织器官发育和细胞间通讯过程中, 具体功能有待利用分子生物学手段进行进一步的分析验证。

### 参考文献(References):

- [1] van der Graaff E, Laux T, Rensing SA. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol*, 2009, 10(12): 248.
- [2] Zhang YZ, Jiao Y, Liu ZH, Zhu YX. ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat Commun*, 2015, 6: 6003.
- [3] Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T. Plant stem cell niches. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 615–636.
- [4] Laux T, Mayer K, Berger J, Jurgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 1996, 122(1): 87–96.
- [5] Wu JB, Song Y, Qiao R, Qiang Y, Wang GD. CLE peptide signaling in balancing the maintenance and differentiation of meristems. *Chin Bull Life Sci*, 2013, 25(4): 421–426.  
吴锦斌, 宋银, 乔睿, 强毅, 王国栋. CLE 多肽参与植物分生组织维持与分化平衡的信号转导研究. *生命科学*, 2013, 25(4): 421–426.
- [6] Clark SE. Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2001, 2(4): 276–284.
- [7] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 2000, 100(6): 635–644.
- [8] Gao XM, and Guo YF. CLE peptides in plants: proteolytic processing, structure-activity relationship, and ligand-receptor interaction. *J Integ Plant Biol*, 2012, 54(10): 738–745.
- [9] Kong XP, Lu SC, Tian HY, Ding ZJ. WOX5 is shining in the root stem cell niche. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(10): 601–603.
- [10] Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 2004, 119(1): 109–120.
- [11] Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 2000, 101(5): 555–567.
- [12] Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Gene Dev*, 2003, 17(3): 354–358.
- [13] Chen Q, Sun JQ, Zhai QZ, Zhou WK, Qi LL, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang HL, Qi J, Li XG, Palme K, Li CY. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses *PLETHORA* expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3335–3352.
- [14] Wang AX, Chen XL. Current status and industrialization of transgenic tomatoes. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(9): 962–974.  
王傲雪, 陈秀玲. 转基因番茄的研究现状及其产业化. *遗传*, 2011, 33(9): 962–974.
- [15] Liu YF, Wan HJ, Yang YJ, Wei YP, Li ZM, Ye QJ, Wang RQ, Ruan MY, Yao ZP, Zhou GZ. Genome-wide identification and analysis of heat shock protein 90 in tomato. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(10): 1043–1052.  
刘云飞, 万红建, 杨悦俭, 韦艳萍, 李志邈, 叶青静, 王荣青, 阮美颖, 姚祝平, 周国治. 番茄热激蛋白 90 的全基因组鉴定及分析. *遗传*, 2014, 36(10): 1043–1052.
- [16] Ding AM, Li L, Qu X, Sun TT, Chen YQ, Zong P, Li ZQ, Gong DP, Sun YH. Genome-wide identification and bioinformatic analysis of PPR gene family in tomato. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(1): 77–84.  
丁安明, 李凌, 屈旭, 孙亭亭, 陈雅琼, 宗鹏, 李尊强, 龚达平, 孙玉合. 番茄 PPR 基因家族的鉴定与生物信息学分析. *遗传*, 2014, 36(1): 77–84.
- [17] Sun TT, Wang DW, Gong DP, Chen L, Chen YQ, Sun YH. Genome-wide identification and bioinformatic analysis of B3 superfamily in tomato. *J Plant Genetic Res*, 2015, 16(4): 806–814.  
孙亭亭, 王大伟, 龚达平, 陈乐, 陈雅琼, 孙玉合. 番茄 B3 超家族成员鉴定及生物信息学分析. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(4): 806–814.

- [18] Zhang Y, Yang SH, Song YJ, Wang JH. Genome-wide characterization, expression and functional analysis of CLV3/ESR gene family in tomato. *BMC Genomics*, 2014, 15: 827.
- [19] Wei ZR, Wang JH, Yang SH, Song YJ, Francki M. Identification and expression analysis of the *LRR-RLK* gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) Heinz 1706. *Genome*, 2015, 58(4): 121–134.
- [20] Zhang X, Zong J, Liu JH, Yin JY, Zhang DB. Genome-wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and *Poplar*. *J Integ Plant Biol*, 2010, 52(11): 1016–1026.
- [21] Lian GB, Ding ZW, Wang Q, Zhang DB, Xu J. Origins and evolution of WUSCHEL-related homeobox protein family in plant kingdom. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014: 534140.
- [22] Hedman H, Zhu TQ, von Arnold S, Sohlberg J J. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 89.
- [23] Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. Ortho MCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res*, 2003, 13(9): 2178–2189.
- [24] Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyn R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1639–1645.
- [25] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1105–1111.
- [26] Huang SX, Gao YF, Liu JK, Peng XL, Niu XL, Fei ZJ, Cao SQ, Liu YS. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(6): 495–513.
- [27] Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674–3676.
- [28] Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 2010, 59(3): 307–321.
- [29] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, 2012, 61(3): 539–542.
- [30] Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2004, 4: 10.
- [31] Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, Nimchuk ZL, Pruneda-Paz JL, Tarr PT, Yan A, Kay SA, Meyerowitz EM. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*, 2015, 517(7534): 377–380.
- [32] Deveaux Y, Toffano-Nioche C, Claisse G, Thareau V, Morin H, Laufs P, Moreau H, Kreis M, Lecharny A. Genes of the most conserved *WOX* clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 291.

(责任编辑: 李传友)