

· 农业生物技术 ·

绿豆 *VrWOX* 基因家族鉴定及表达分析

郭旭^{1#}, 张慧莹^{1#}, 王铮¹, 李帅^{1*}

青岛农业大学生命学院, 山东 青岛 266109

郭旭, 张慧莹, 王铮, 李帅. 绿豆 *VrWOX* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 566-585.

GUO Xu, ZHANG Huiying, WANG Zheng, LI Shuai. Molecular characterization and transcriptional analysis of *VrWOX* genes in mungbean [*Vigna radiate* (L.) Wilczek][J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 566-585.

摘 要: *WOX* (*WUSCHEL*-related homeobox) 基因家族是植物特有的一类转录因子, 是同源盒 (homeobox, HB) 转录因子超家族中的重要成员。 *WOX* 基因在植物干细胞调节及生殖发育过程中具有重要作用, 其功能已在多个植物物种中鉴定。然而绿豆 (*Vigna radiate*) *VrWOX* 基因家族信息尚不清楚。本研究通过同源比对和聚类分析, 在绿豆基因组中鉴定了 42 个 *VrWOX* 基因。 *VrWOX* 基因在绿豆染色体中分布不均, 其中 7 号染色体含有的 *VrWOX* 数量最多。 *VrWOX* 基因分为古老进化支 (19 个 *VrWOX*)、中等进化支 (12 个 *VrWOX*) 和年轻进化支 (*WUSCHEL* 进化支, 11 个 *VrWOX*) 3 个亚类。种内和种间共线性分析发现, *VrWOX* 基因共有 12 个重复事件, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtWOX* 有 15 个同源基因对, 与菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) *PvWOX* 有 22 个同源基因对。 *VrWOX* 基因在基因结构、保守基序等方面存在很大差异, 因而可能存在功能差异。 *VrWOX* 基因启动子区域含有不同种类和不同数量的顺式作用元件, 导致 *VrWOX* 基因在不同组织中表现出不同的基因表达模式。本研究对 *VrWOX* 基因家族信息和表达模式进行了分析, 为绿豆 *VrWOX* 基因功能和调控网络的解析奠定了一定的理论依据。

关键词: 绿豆; *VrWOX*; 基因家族; 共线性分析; 基因表达

资助项目: 国家自然科学基金 (32171979, 31971898); 山东省高等学校“青创科技支持计划” (2021KJ029)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171979, 31971898), and the Program for Scientific Research Innovation Team of Young Scholar in Colleges and Universities of Shandong Province, China (2021KJ029).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: li2014shuai@qau.edu.cn

Received: 2022-08-29; Accepted: 2022-11-21; Published online: 2022-11-26

Molecular characterization and transcriptional analysis of *VrWOX* genes in mungbean [*Vigna radiate* (L.) Wilczek]

GUO Xu^{1#}, ZHANG Huiying^{1#}, WANG Zheng¹, LI Shuai^{1*}

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: *WUSCHEL*-related homeobox (*WOX*) gene family is a type of plant specific transcription factor, and belongs to the homeobox (HB) transcription factor superfamily. *WOX* genes play an important role in plant development, such as stem cell regulation and reproductive progress, and have been identified in many plant species. However, the information of mungbean *VrWOX* genes is limited. In this study, we identified 42 *VrWOX* genes in mungbean genome using *Arabidopsis AtWOX* genes as BLAST queries. *VrWOX* genes are unevenly distributed on 11 mungbean chromosomes, and chromosome 7 contains the most *VrWOX* genes. *VrWOX* genes are classified into three subgroups, the ancient group, the intermediate group and the modern/*WUSCHEL* group, which contains 19, 12 and 11 *VrWOX* members, respectively. Intraspecific synteny analysis revealed 12 *VrWOX* duplicated gene pairs in mungbean. Mungbean and *Arabidopsis thaliana* have 15 orthologous genes, and mungbean and *Phaseolus vulgaris* have 22 orthologous genes, respectively. The gene structure and conserved motif are different among *VrWOX* genes, indicating their functional diversity. The promoter regions of *VrWOX* genes contain different number and type of *cis*-acting elements, and *VrWOX* genes show distinct expression levels in eight mungbean tissues. Our study investigated the bioinformation and expression profiles of *VrWOX* genes, and provided essential information for further functional characterization of *VrWOX* genes.

Keywords: mungbean; *VrWOX*; gene family; synteny analysis; gene expression

WOX (*WUSCHEL*-related homeobox)基因家族属于同源盒(homeobox, HB)转录因子家族^[1], 是一种植物特异性转录因子, 在植物中广泛存在。*WOX*基因家族成员含有一个保守的HB结构域, 该结构通常含有 60–66 个氨基酸, 通过螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)特殊结构结合DNA, 进而调控下游基因表达^[2]。*WOX*基因家族广泛参与植物生长发育活动, 如胚胎早期发育和极性形成、叶片发育和干细胞分化等^[3–4]。

近年来随着分子技术的发展, *WOX*基因家

族成员的功能逐渐得到解析, 其中在模式植物拟南芥中的功能研究相对比较清晰。拟南芥中 *AtWOX* 基因家族的鉴定是基于 *AtWUS* (*AtWUSCHEL*)基因的编码序列, 通过序列比对, 在拟南芥数据库中查找相关序列并最终确定了 15 个 *AtWOX* 基因。根据其进化关系, Haecker 等^[3]将 15 个 *AtWOX* 基因划分到 3 个进化支(亚类): *AtWOX10*、*AtWOX13* 和 *AtWOX14* 属于古老进化支; *AtWOX8*、*AtWOX9*、*AtWOX11* 和 *AtWOX12* 属于中等进化支; *AtWUS* 及 *AtWOX1–AtWOX7* 属于年轻进化支也称为 WUS

进化支。通常高等植物的 *WOX* 基因存在于以上 3 个进化支上, 而低等植物如藻类、苔藓中的 *WOX* 基因只存在于古老进化支^[1]。年轻进化支上的 *AtWOX* 基因成员主要参与拟南芥干细胞调节、胚胎发育及生殖发育, 而其他进化支上的 *AtWOX* 基因不具有调节干细胞的功能^[5]。

AtWUS 基因通过维持多能干细胞参与植物细胞去分化过程, 进而调控细胞命运。在芽分生组织中, *AtWUS* 和 *AtCLV* 基因(*AtCLAVATA*)形成反馈环动态平衡调节干细胞稳态^[4]。*AtWUS* 主要参与芽和花分生组织干细胞调节^[6], 在植物中被广泛研究。此外, 研究发现 *AtWUS* 是植物中唯一一个已被证实可参与调节全能干细胞和多能干细胞的转录因子。*AtWOX1* 和 *AtWOX3* 具有一定的功能冗余, 均能参与叶缘分生组织及板状分生组织活性调控, 促进叶片细胞增殖, 增大叶片面积^[7]。*AtWOX2* 参与调控植物胚胎发育, 如分裂时间及方向等^[3], 其在裸子植物海岸松(*Pinus pinaster*)中的同源基因 *PpWOX2* 表现为组成型表达, 调控子叶胚胎的数量及质量^[8], 影响胚胎发育。*AtWOX4* 和 *AtWOX5* 参与拟南芥形成层和根分生组织中的干细胞调节^[9-10]。*AtWOX6* 参与调节拟南芥胚珠发育, 并在胚珠中大量表达^[11]。*AtWOX7* 通过直接抑制细胞周期基因调节侧根发育^[12]。中等进化支上的 *AtWOX8* 和 *AtWOX9* 主要参与受精卵极性建立, 进而完成不对称的细胞分裂^[13]。位于古老进化支的 *AtWOX10* 目前还未有相关文献报道其功能。*AtWOX11* 和 *AtWOX12* 具有一定的功能冗余, 主要参与干细胞从原形成层细胞向根器官发生的过渡过程^[14]。*AtWOX13* 主要参与植物从营养生长向生殖生长的转变^[15], 该基因也被证明是拟南芥愈伤组织形成及器官重新连接的关键调节因子, 参与嫁接过程中供受体器官重新连接^[16]。*AtWOX14* 促进生物活性赤霉素(gibberellins, GAs)的积累, 并诱

导茎维管组织径向生长的木质化^[17], 与 *AtWOX4* 在木质部信号通路调控途径中具有一定的功能冗余作用^[18]。

以上可以看出 *WOX* 基因家族成员主要参与拟南芥关键发育过程的调控。除拟南芥外, 在其他物种中也鉴定出了 *WOX* 基因家族, 如双子叶植物中的杨树(*Populus*)^[19]、油菜(*Brassica napus*)^[20]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[21]和茄子(*Solanum melongena*)^[22]等; 单子叶植物中的水稻(*Oryza sativa*)^[19]、玉米(*Zea mays*)^[19]、小麦(*Triticum aestivum*)^[23]和松树(*Pinus Linn*)^[24]等。在豆科植物中, 部分 *WOX* 基因家族也被报道, 如: 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)和大豆(*Glycine max*), 分别含有 19、19 和 33 个 *WOX* 基因^[25]。对于豆科植物中的一些基因功能也有相关研究, 如蒺藜苜蓿中 *STF* (*STENOFOLIA*, 拟南芥 *AtWOX1* 同源基因)是叶缘分生组织中细胞分裂的必需基因^[26], *STF* 可抑制 *MtWOX9* 活性, 两者拮抗调控叶片生长^[27]; *MtWOX5* 可参与苜蓿结瘤分生组织的发育^[28]; 在大豆中过表达 *GmWOX18* 能够促进丛生芽的再生, 提高大豆的遗传转化效率^[25]; 另外在豌豆(*Pisum sativum*)中有研究表明, *AtWOX1* 的同系物 *LATH* (*LATHYROIDES*)参与控制叶片扩展和花的发育过程^[29]。

绿豆(*Vigna radiata*)是一种重要的豆科作物, 是蛋白质、膳食纤维、矿物质和维生素的极好来源^[30], 且可改善“三高”, 预防癌症, 并具有保肝和提高免疫的功能, 是一种药食同源的功能性杂粮作物^[31], 具有非常重要的营养价值。然而目前在绿豆中还没有关于 *VrWOX* 基因家族的报道。*WOX* 基因在各种生理和发育阶段发挥着关键作用, 绿豆 *VrWOX* 基因家族的鉴定与功能研究将为定向改造绿豆, 提高绿豆的产量和生态适应性提供重要的基因资源。本研究鉴定

了 42 个绿豆 *VrWOX* 基因家族成员, 对该基因家族成员进行了分类, 解析了其基因结构、种内和种间共线性、启动子顺式作用元件、基因表达模式及蛋白互作网络等。本研究的开展有助于了解绿豆 *VrWOX* 基因家族的结构和功能, 为进一步解析绿豆中该家族成员的功能提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因组数据获取

根据 Haecker 等^[3]提到的拟南芥 15 个 *AtWOX* 基因家族成员, 利用 *AtWOX* 基因号从 TAIR10 (<https://www.arabidopsis.org>)^[32]网站上获取 *AtWOX* 氨基酸序列。大豆、菜豆和蒺藜苜蓿的 *WOX* 基因家族成员的氨基酸序列均从 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>)网站上获取^[25]。

1.2 绿豆 *VrWOX* 基因家族成员鉴定

根据 *WOX* 基因家族的 pfam family 编号 PF00046, 利用 HMMER^[33]工具对绿豆全基因组进行鉴定, 筛选出含有保守结构域的绿豆 *VrWOX* 基因家族候选基因。根据文献中提到的 15 个拟南芥的 *AtWOX* 基因家族成员的氨基酸序列^[3], 通过序列比对 (BLAST)^[34]在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站上获得绿豆 *VrWOX* 基因家族候选基因。进一步通过 BLAST 和 HMMER 双重筛选确定 *VrWOX* 基因家族成员。*VrWOX* 基因家族成员的染色体位置、氨基酸数目从 NCBI 数据库中获得; 同时利用在线工具 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)对 *VrWOX* 基因进行等电点、分子量分析。

1.3 *VrWOX* 基因序列比对及进化分析

为探究绿豆与拟南芥、大豆、菜豆和蒺藜苜蓿 *WOX* 基因之间的进化关系, 将获得氨基酸序

列通过 MUSCLE 软件进行多重序列比对, 然后利用 FastTree^[35]构建最大似然法 (maximum likelihood method, ML) 系统发生树, 最后将 ML 系统发生树文件输入到 ITOL 网站 (<https://itol.embl.de/itol.cgi>) 中进行注释和优化。为鉴定绿豆 *VrWOX* 基因进化关系, 利用 FastTree^[35]对绿豆 *VrWOX* 基因家族成员的氨基酸序列进行分析, 并利用近邻相接法构建系统发生树, 最后利用 ITOL 网站进行优化。

1.4 基因结构和 motif 分析

为鉴定 *VrWOX* 基因结构, 利用从 NCBI 获取的 *VrWOX* 基因家族成员的内含子和外显子等基因信息, 在 GSDS (Gene Structure Display Server)^[36]网站上进行可视化分析。为鉴定 *VrWOX* 蛋白保守区域位置, 通过 pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 网站查找所有 *VrWOX* 基因蛋白结构域, 使用 GSDS 软件绘制 *VrWOX* 基因蛋白的保守 HB 结构域。为鉴定 *VrWOX* 蛋白 motif, 利用 *VrWOX* 基因氨基酸序列, 在 MEME (Multiple Em for Motif Elicitation)^[37]网站上进行分析, 参数为默认参数, 每个基序的序列长度范围: 6–150, 最后利用 ITOL 网站进行可视化分析。

1.5 重复基因分析

为鉴定 *VrWOX* 基因在染色体上的位置, 在 NCBI 获取 *VrWOX* 基因家族成员的基因注释文件, 整理基因的位置信息并利用 MapChart 软件^[38]进行可视化分析。为分析 *VrWOX* 基因家族成员的重复关系, 通过 MCScanX 工具^[39]对家族成员进行共线性分析, 使用默认参数输出数据, 结果利用 CIRCOS 软件^[40]进行展示。此外, 下载了拟南芥 *WOX* 和菜豆 *WOX* 基因家族成员的基因注释文件, 通过 MCScanX 工具^[39]对家族成员进行共线性分析, 使用默认参数输出数据, 结果利用 CIRCOS 软件^[40]进行展示。

1.6 顺式作用元件分析

为分析 *VrWOX* 基因启动子元件, 从 NCBI 上获取 *VrWOX* 基因家族各个成员的启动子序列(选取起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 区域), 并上传至 PlantCARE (<https://bioinf-ormatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[41] 对选取序列进行分析, 使用 GSDS^[36] 软件对所分析的顺式作用元件在启动子上的位置进行绘图, 并根据每个顺式作用元件功能进行总结归类。

1.7 *VrWOX* 基因在绿豆各组织的表达量分析

为鉴定绿豆 *VrWOX* 基因在不同组织的表达, 在山东青岛大田中种植中绿一号绿豆。在 7 月份绿豆植株开花结荚后, 收集植株的根、根瘤、茎、茎尖、叶、花、荚和种子的材料。提取 RNA, 反转录成 cDNA, 实验方法如 Li 等^[42]所述。利用 NCBI 设计 *VrWOX* 基因家族成员的实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 引物, 通过实时荧光定量 PCR 测定 42 个 *VrWOX* 基因在这 8 个组织中的表达, 利用 *VrActin* (*Vradi03g00210*) 作为内参计算目的基因表达量。为分析 *VrWOX* 基因在不同组织器官的表达情况, 对表达量数据进行处理(\log_2 转换), 然后通过 Tbtools^[43] 工具绘制热图。实时荧光定量 PCR 实验方法如 Ma 等^[44]所述, 实时荧光定量 PCR 所使用的引物见表 1。

1.8 *VrWOX* 基因家族 Ka/Ks 分析

在 NCBI 上获取绿豆 *VrWOX* 基因和蛋白质数据, 使用 MCSanX 软件^[39]对 *WOX* 家族进行共线性分析, 选择具有共线性的基因对, 通过计算非同义替换率(Ka)与同义替换率(Ks)的比值来推断选择压力, 进而研究重复基因在进化过程中的选择压力。

1.9 绿豆 *VrWOX* 基因家族蛋白互作预测

以拟南芥 *WOX* 同源蛋白序列为基础, 在 STRING (<https://string-db.org/>) 网站上传拟南芥和绿豆的 *WOX* 氨基酸序列, 分析预测 *VrWOX* 互作蛋白, 并在该网页上输出 *VrWOX* 蛋白互作网络图。

2 结果与分析

2.1 绿豆 *VrWOX* 基因家族鉴定

为鉴定绿豆 *VrWOX* 基因家族成员, 根据 *WOX* 基因家族的 pfam family 编号 PF00046, 利用 HMMER 工具对绿豆全基因组进行分析, 筛选出含有保守结构域的绿豆 *VrWOX* 基因家族候选基因。然后利用 15 个拟南芥 *AtWOX* 基因氨基酸序列, 在 NCBI 数据库中比对, 最终确定 42 个 *VrWOX* 基因家族成员(表 2)。根据 42 个绿豆 *VrWOX* 蛋白质序列编号(Gene ID), 按照从小到大的原则, 将其分别命名为 *VrWOX1* 至 *VrWOX42* (表 2)。根据 *VrWOX* 基因染色体位置信息, 将 42 个 *VrWOX* 成员在染色体上的位置进行可视化分析(图 1)。由于 *VrWOX1*、*VrWOX2*、*VrWOX3*、*VrWOX4*、*VrWOX39* 缺少染色体位置信息, 因而在图 1 未显示。在绿豆 11 对染色体中, 7 号染色体含有 *VrWOX* 基因数量最多, 为 7 个, 分别为 *VrWOX21*、*VrWOX22*、*VrWOX23*、*VrWOX24*、*VrWOX26*、*VrWOX27* 和 *VrWOX42*; 而 8 号、9 号和 11 号染色体均含有 2 个 *VrWOX* 基因, 数量最少。对 42 个 *VrWOX* 基因的蛋白质序列和理化性质进行分析(表 2), 发现 *VrWOX* 蛋白含有的氨基酸数目范围为 151 (*VrWOX2*)—847 (*VrWOX41*); 分子量大小范围为 17.48 kDa (*VrWOX2*)至 92.99 kDa (*VrWOX41*); 等电点大小范围为 4.50 (*VrWOX39*)至 10.45 (*VrWOX11*), 因而 *VrWOX* 既存在碱性蛋白又存在酸性蛋白(表 2)。

表 1 本研究中所使用的 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The qRT-PCR primers used in this study

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Purposes
<i>VrWOX1</i>	AGGGAACAAGACAGCACACA	TTTCCCAGCCATGTAGCACC	qRT-PCR
<i>VrWOX2</i>	ATTGCAGAACGACTTCGGGT	TGTACGCCGGTAGGAGAGAA	qRT-PCR
<i>VrWOX3</i>	GCTACTTCAAACATGGGTCTTGG	TGTTGTCCACCACCACTACA	qRT-PCR
<i>VrWOX4</i>	GTTGCACTTCTCGACCCCTC	TAGAGCTCCTTGGGTGGTGG	qRT-PCR
<i>VrWOX5</i>	GGCTTGAAGGCCACTCTCTT	TACGAGCTCAGAACAAGCCC	qRT-PCR
<i>VrWOX6</i>	ACCCTCAATCACGACAACGA	CACCGCTTCTGTGTTCTCT	qRT-PCR
<i>VrWOX7</i>	GCGTCGCAAGGTTGATAAGG	CACCGAAAGAGTTCAAGGGGA	qRT-PCR
<i>VrWOX8</i>	GGAGGTGCAGGAAGATACGAG	AGCTTTAGGGCTAGGTCTCTCT	qRT-PCR
<i>VrWOX9</i>	GGGGGCCAATGGACATCAAA	CAAGCCCTGCATCAAGAAACC	qRT-PCR
<i>VrWOX10</i>	CTGCTCCCATAGAGAAGGCG	GTCTCGAGTTGTTTCGTCGGT	qRT-PCR
<i>VrWOX11</i>	ATGCGGACTCCAAATGCTGA	GCTTCTGTCTTTGACGTGCT	qRT-PCR
<i>VrWOX12</i>	GGTTGCAGAAGGAGGTCCAA	GAGTGACCACGCTCACAAGA	qRT-PCR
<i>VrWOX13</i>	AACTGCAGAACAGCGTAGGG	TGTGGGGACTGAGGATGTGT	qRT-PCR
<i>VrWOX14</i>	CAAGGATCCACCTTCACCCC	AGCATTCGAGATTCTCGTCC	qRT-PCR
<i>VrWOX15</i>	TGCCTCAATCGCTATCGGAA	CAAGCTGTTTCGAGATGGTG	qRT-PCR
<i>VrWOX16</i>	CCTGCGGGAGCATAGATCAG	TGGTGTGGGCTAGAGGAAGA	qRT-PCR
<i>VrWOX17</i>	GTAGCGAATCCTCCGCTTCT	AGCCAAAGTCAGCTCGTTCC	qRT-PCR
<i>VrWOX18</i>	TGGTCTTGGCCTTGGTCTTG	CACCCTTCTGGTGTGTTGGG	qRT-PCR
<i>VrWOX19</i>	CAAACGCTTACGACCCCTTG	AAGTTGTGACAGGAGGCGAA	qRT-PCR
<i>VrWOX20</i>	CCGCAAGCTCTCCTTTGATG	TTGAAGCGTCTCAATCACCTT	qRT-PCR
<i>VrWOX21</i>	ACTGCACAAGGCAGAAACCT	ATGGGTGACGTTTGGAGTGG	qRT-PCR
<i>VrWOX22</i>	GCTGCAAGAGCTAAAGGCAC	TAGGAGCCATGGAGAAGGGT	qRT-PCR
<i>VrWOX23</i>	TTCACGTTCCGGTTCCAG	TGGCAGATCATCGATAGTGGAAA	qRT-PCR
<i>VrWOX24</i>	CCCACCGTCATTCTCCACA	GGTGGGACTTTAGCGGACAA	qRT-PCR
<i>VrWOX25</i>	TGATCATCACCATTGCTCTC	TCCACCTTGAGCTCACAACAA	qRT-PCR
<i>VrWOX26</i>	AGAAGACGGCGAAACCTCAA	CTTTGCCAGTGCCAGCTTTT	qRT-PCR
<i>VrWOX27</i>	TGAGAACCATTGCGGGACA	TCTGTACTGAGCCGAGAGGG	qRT-PCR
<i>VrWOX28</i>	GAGCTTAGGCGACACTTCCA	CCCTTTACCCGGTCTATGC	qRT-PCR
<i>VrWOX29</i>	TCCTGATTCCAACAAGCCGT	TTCCACCTGCACACTCACTC	qRT-PCR
<i>VrWOX30</i>	GGGGGAAAAGAGAAGGGGTG	GGAAGCGTGGAATTCTGGGA	qRT-PCR
<i>VrWOX31</i>	CCTCAACCTGTTCCAAGCCA	GGTGGCTCAGAGCTTCGATT	qRT-PCR
<i>VrWOX32</i>	TGTGAGTAAAGCGAAGGGTGA	TCTCCCCGATCTCACAACCT	qRT-PCR
<i>VrWOX33</i>	TGGAAGGGAAGACAAGGGTG	TGGTTTTGCTTCAGGCTTCC	qRT-PCR
<i>VrWOX34</i>	GGATACATGTTTACACAGACCTT	GGCGAACGAGAAGAAGCAGT	qRT-PCR
<i>VrWOX35</i>	AGACATATGCGCCCAACA	GGGACCACCAGTTGAGGATG	qRT-PCR
<i>VrWOX36</i>	CGGTTACCTTCTGCGGTTGA	TCCCTCTCGCTACGCTTTTC	qRT-PCR
<i>VrWOX37</i>	ATTCTCACCCTACGCCAAC	AGCCATGAATGTCCTCACCG	qRT-PCR
<i>VrWOX38</i>	CCGCTAACC GCCATGTTTTC	TGGGTTGTGAAGGAGGTGTG	qRT-PCR
<i>VrWOX39</i>	CCACACCCATGGTCTTCCTC	CGGAAGCAGGTGTTTGGTTG	qRT-PCR
<i>VrWOX40</i>	CCCAGAATATTGTCAGGCCCA	ACAAAAGGAAAATAAGGGATGAAGT	qRT-PCR
<i>VrWOX41</i>	GTCGAGCATGGGTAGACCAG	TCTTTCCTACATCCTACAGTGTTT	qRT-PCR
<i>VrWOX42</i>	GACAGACACAACCACGCTGA	GCTTGGCCAGTGTTTATTGGA	qRT-PCR
<i>VrActin</i>	CAGTGTCTGGATTGGAGGCT	GTCCTCGACCACTTGATG	qRT-PCR

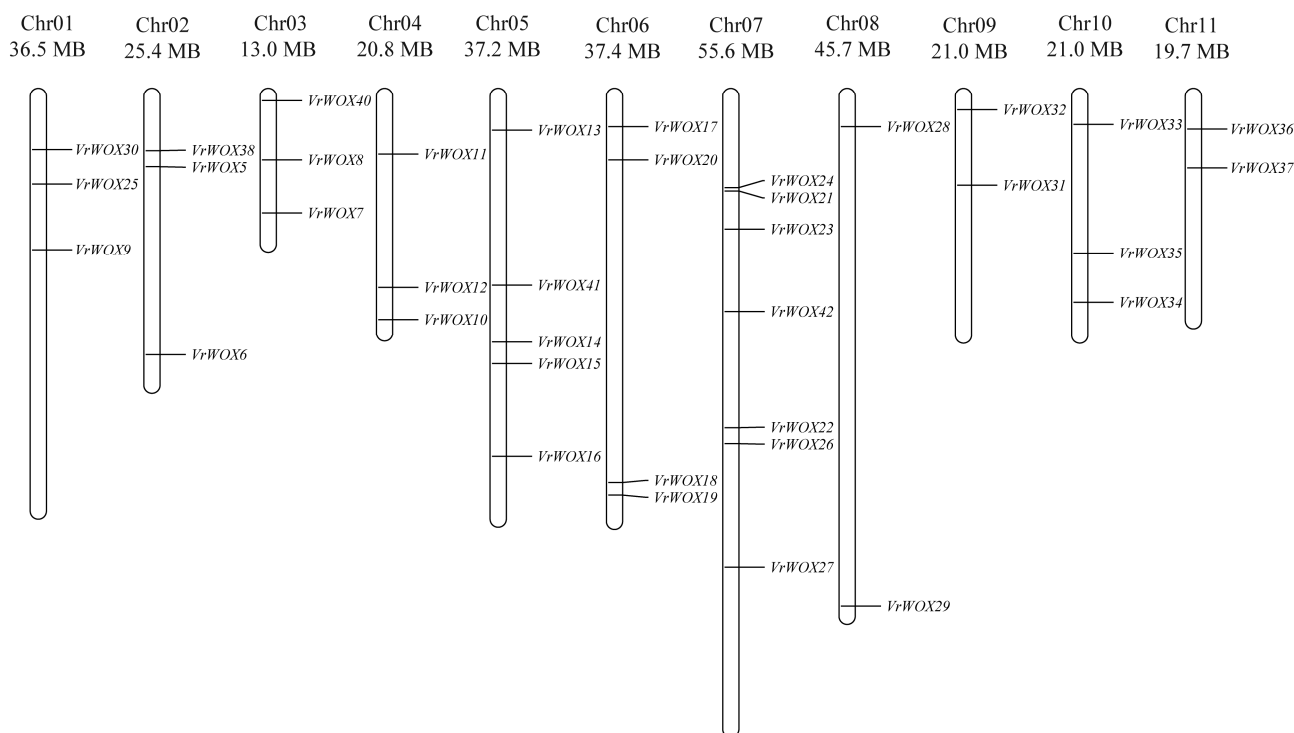


图1 *VrWOX* 基因在 11 条绿豆染色体上的分布

Figure 1 Distribution of *VrWOX* family members in mungbean chromosomes. The chromosome number and size are shown.

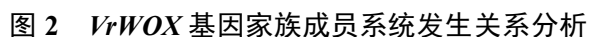
2.2 绿豆 *VrWOX* 基因进化分析及重复基因鉴定

为研究 *VrWOX* 基因家族成员的进化关系, 利用拟南芥、菜豆、大豆、蒺藜苜蓿和绿豆 *WOX* 基因家族成员的氨基酸序列构建了系统发生树。根据系统发生树分支, 将 *VrWOX* 基因家族成员分为 3 个亚类(亚类I古老进化支、亚类II中等进化支、亚类III年轻进化支也叫作 WUS 进化支)(图 2)^[1,3]。亚类I古老进化支含有 19 个 *VrWOX* 基因, 亚类II中等进化支含有 12 个 *VrWOX* 基因, 其余 11 个 *VrWOX* 属于亚类III年轻进化支。在这几个物种中, 绿豆 *VrWOX* 与菜豆 *PvWOX* 同源关系较近, 普遍存在同一亚支上。多个 *VrWOX* 基因与已知功能的其他物种中 *WOX* 基因同源关系较近, 因而它们可能具有类似的功能。例如,

VrWOX37 与拟南芥 *AtWUS* 基因位于同一个分支上, 因而 *VrWOX37* 可能与 *AtWUS* 具有类似的功能, 参与植物干细胞稳态平衡(图 2)。绿豆基因组在长期进化过程中经历过一次全基因组加倍, 因而可能存在重复基因^[45-46]。利用 MCScanX 软件对 *VrWOX* 的基因重复模式进行分析(图 3)。通过共线性分析, 共发现 12 对 *VrWOX* 重复基因, 分别为 *VrWOX7/20*、*VrWOX10/29*、*VrWOX11/38*、*VrWOX12/31*、*VrWOX14/19*、*VrWOX16/32*、*VrWOX16/41*、*VrWOX25/30*、*VrWOX26/36*、*VrWOX28/40*、*VrWOX32/41*、*VrWOX34/42*。*VrWOX* 重复基因在绿豆 11 对染色体中均有分布, 其中包含 2 个染色体内部重复事件(*VrWOX16/41*、*VrWOX25/30*)和 10 个染色体间重复事件(图 3A)。

表 2 *VrWOX* 基因基本信息Table 2 *VrWOX* genes identified in mungbean genome

Gene ID	Chr	Length of amino acid	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	Group	Gene name
XP_014490274	N/A	817	89.04	6.42	I	<i>VrWOX1</i>
XP_014490519	N/A	151	17.48	8.92	III	<i>VrWOX2</i>
XP_014491062	N/A	283	30.94	7.02	II	<i>VrWOX3</i>
XP_014492048	N/A	202	23.27	7.99	III	<i>VrWOX4</i>
XP_014494018	2	842	92.02	6.08	II	<i>VrWOX5</i>
XP_014494340	2	301	34.46	4.63	I	<i>VrWOX6</i>
XP_014495086	3	176	20.48	6.93	III	<i>VrWOX7</i>
XP_014495698	3	234	27.13	8.72	I	<i>VrWOX8</i>
XP_014496114	1	280	30.82	7.03	II	<i>VrWOX9</i>
XP_014496474	4	267	30.18	4.91	I	<i>VrWOX10</i>
XP_014496704	4	195	22.08	10.45	III	<i>VrWOX11</i>
XP_014497427	4	296	33.05	7.78	I	<i>VrWOX12</i>
XP_014498994	5	236	26.55	10.04	I	<i>VrWOX13</i>
XP_014500317	5	225	25.99	9.98	III	<i>VrWOX14</i>
XP_014500511	5	216	24.56	6.40	I	<i>VrWOX15</i>
XP_014501306	5	837	92.26	6.46	II	<i>VrWOX16</i>
XP_014502850	6	526	59.49	7.43	II	<i>VrWOX17</i>
XP_014503808	6	314	35.68	6.67	I	<i>VrWOX18</i>
XP_014503920	6	234	26.83	9.44	III	<i>VrWOX19</i>
XP_014504325	6	184	21.24	8.84	III	<i>VrWOX20</i>
XP_014506266	7	307	34.76	7.07	III	<i>VrWOX21</i>
XP_014507042	7	275	30.81	8.50	I	<i>VrWOX22</i>
XP_014507975	7	319	37.02	4.76	I	<i>VrWOX23</i>
XP_014508300	7	214	24.01	8.13	I	<i>VrWOX24</i>
XP_014508867	1	360	40.75	6.91	III	<i>VrWOX25</i>
XP_014509478	7	290	32.40	8.09	I	<i>VrWOX26</i>
XP_014509941	7	846	92.96	6.55	II	<i>VrWOX27</i>
XP_014512318	8	323	35.93	7.74	I	<i>VrWOX28</i>
XP_014512537	8	281	31.63	6.78	I	<i>VrWOX29</i>
XP_014514810	1	362	41.09	8.35	III	<i>VrWOX30</i>
XP_014515436	9	296	32.05	7.87	I	<i>VrWOX31</i>
XP_014516466	9	836	92.16	6.43	II	<i>VrWOX32</i>
XP_014517123	10	245	28.44	5.84	I	<i>VrWOX33</i>
XP_014517469	10	394	42.85	8.31	II	<i>VrWOX34</i>
XP_014518680	10	846	92.78	6.14	II	<i>VrWOX35</i>
XP_014519357	11	290	32.45	7.33	I	<i>VrWOX36</i>
XP_014519639	11	350	39.17	6.84	III	<i>VrWOX37</i>
XP_014522125	2	237	26.66	6.01	III	<i>VrWOX38</i>
XP_014522235	N/A	317	35.81	4.50	I	<i>VrWOX39</i>
XP_022634669	3	262	29.44	7.18	I	<i>VrWOX40</i>
XP_022636494	5	847	92.99	6.55	II	<i>VrWOX41</i>
XP_022640191	7	378	42.07	8.00	II	<i>VrWOX42</i>



为鉴定绿豆 *VrWOX* 重复基因在进化过程中的选择压力,对 12 个 *VrWOX* 重复事件进行了 Ka/Ks 分析(表 3)。若 *VrWOX* 基因 Ka/Ks 比率大于 1,则认为 *VrWOX* 基因在进化过程中受到正选择效应,可加速基因进化;若 *VrWOX* 基因 Ka/Ks 比率等于 1,则认为 *VrWOX* 基因存在

中性选择,即自然选择对 *VrWOX* 基因进化没有影响;若 *VrWOX* 基因 Ka/Ks 比率小于 1,则认为 *VrWOX* 基因经过了纯化选择^[47]。我们发现 12 个 *VrWOX* 重复事件的 Ka/Ks 值在 0.040 795–0.284 845 之间,所有 Ka/Ks 值均小于 1。因而 *VrWOX* 重复基因在进化过程中得到了纯化选择

(表 3)。

此外,为了研究绿豆 *VrWOX* 基因家族在种间的进化关系,选取模式生物拟南芥和与绿豆进化关系较近的菜豆作为研究对象,分别对绿豆和拟南芥及绿豆和菜豆的 *WOX* 基因进行了共线性分析。研究发现 42 个绿豆 *VrWOX* 基因和 15 个拟南芥 *AtWOX* 基因中有 15 个 *WOX* 同源

基因对(图 3B), 42 个绿豆 *VrWOX* 基因和 17 个菜豆 *PvWOX* 基因间有 22 个同源基因对(图 3C)。这些同源基因对之间可能存在功能保守现象。

2.3 *VrWOX* 基因结构分析

为研究 *VrWOX* 的基因结构,利用从 NCBI 数据库中获得 *VrWOX* 基因序列(包括非编码区域、外显子和内含子),绘制了 *VrWOX* 基因结

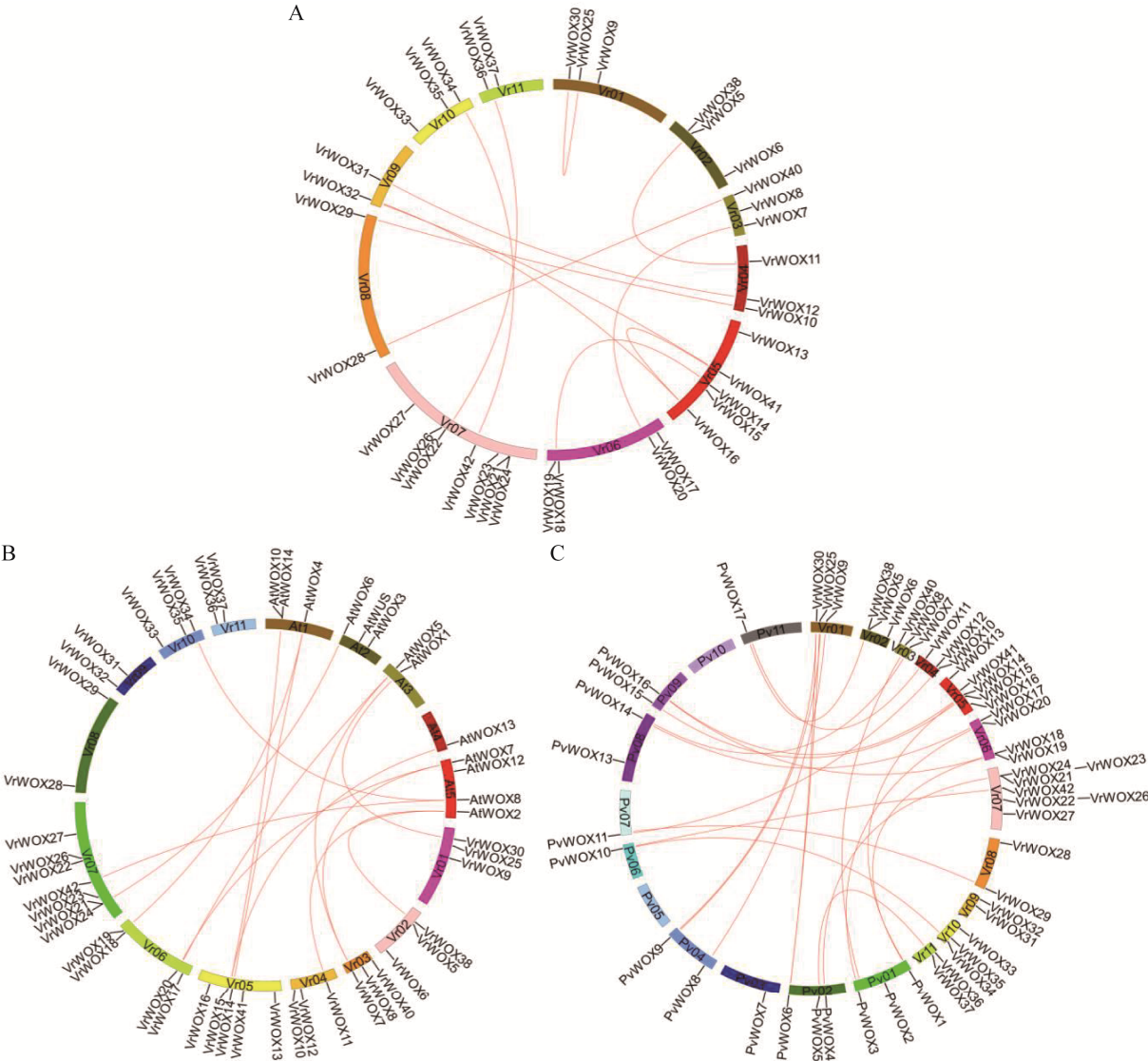


图 3 *VrWOX* 基因所在区域共线性分析

Figure 3 Synteny analysis of chromosome regions where *VrWOX* genes are located. Synteny analysis of *VrWOX* family genes (A), mungbean and *Arabidopsis* *WOX* genes (B), mungbean and *Phaseolus vulgaris* *WOX* genes (C). For the chromosome regions that have synteny, the *WOX* genes are connected using red lines.

表3 绿豆 *VrWOX* 重复基因 Ka/Ks 比率分析Table 3 The Ka/Ks ratios of *VrWOX* duplication events in mungbean

<i>VrWOX</i> gene 1	<i>VrWOX</i> gene 2	Ka	Ks	Ka/Ks	Selective pressure	Duplicate type
<i>VrWOX7</i>	<i>VrWOX20</i>	0.164 354	0.753 307	0.218 177	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX10</i>	<i>VrWOX29</i>	0.153 983	1.939 590	0.079 390	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX12</i>	<i>VrWOX31</i>	0.208 719	1.708 740	0.122 147	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX14</i>	<i>VrWOX19</i>	0.135 960	0.625 102	0.217 500	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX16</i>	<i>VrWOX32</i>	0.027 554	0.675 432	0.040 795	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX26</i>	<i>VrWOX36</i>	0.118 224	0.825 982	0.143 131	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX30</i>	<i>VrWOX25</i>	0.188 130	0.660 466	0.284 845	Purifying selection	Intrachromosomal
<i>VrWOX38</i>	<i>VrWOX11</i>	0.381 879	1.828 990	0.208 792	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX40</i>	<i>VrWOX28</i>	0.204 308	0.827 525	0.246 890	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX41</i>	<i>VrWOX32</i>	0.103 556	1.661 530	0.062 326	Purifying selection	Interchromosomal
<i>VrWOX41</i>	<i>VrWOX16</i>	0.098 932	1.745 140	0.056 690	Purifying selection	Intrachromosomal
<i>VrWOX42</i>	<i>VrWOX34</i>	0.234 842	1.078 820	0.217 685	Purifying selection	Interchromosomal

构图(图 4B)。从基因结构图中可以看出所有 *VrWOX* 基因均含有 2 个及以上内含子; 另外, 除 *VrWOX2* 和 *VrWOX11* 外, 所有 *VrWOX* 基因都包含 UTR 结构。*VrWOX* 基因家族成员含有不同数目的内含子和外显子。*VrWOX* 基因含有的外显子数目为 2 (*VrWOX2*、*VrWOX4*、*VrWOX7*、*VrWOX11*、*VrWOX20* 和 *VrWOX33*)–18 (*VrWOX5*、*VrWOX16*、*VrWOX27*、*VrWOX32*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41*)(图 4B)。亚类 I 古老进化支中 *VrWOX* 外显子数目为 2–9 个; 亚类 II 中等进化支中 *VrWOX* 基因外显子数目变化较大, 为 2–18 个, 其中一半的亚类 II 中等进化支中 *VrWOX* 基因含有 18 个外显子(*VrWOX5*、*VrWOX16*、*VrWOX27*、*VrWOX32*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41*); 亚类 III 年轻进化支中 *VrWOX* 外显子数目为 2–4 个。

2.4 绿豆 *VrWOX* 基因家族保守序列分析

为进一步鉴定 *VrWOX* 蛋白之间的保守性, 利用 MEME^[37] 软件对 *VrWOX* 成员的氨基酸序列保守区域进行预测(图 4C, 图 5)。总共发现 20 个 motif, 其中 motif 1 和 motif 2 存在于所有的 *VrWOX* 家族成员中。然而不同进化支上 *VrWOX* 蛋白的 motif 组成模式差异很大。亚类 I

古老进化支上 *VrWOX* 成员的 motif 分布很有特点, 例如, *VrWOX10*、*VrWOX15* 和 *VrWOX29* 含有相同的 motif 20, 并且 motif 20 只存在于这 3 个蛋白中; *VrWOX6*、*VrWOX8*、*VrWOX23*、*VrWOX33* 和 *VrWOX39* 含有 3 个相同的 motif: motif 1、motif 2 和 motif 4; *VrWOX12*、*VrWOX13*、*VrWOX18*、*VrWOX22*、*VrWOX24*、*VrWOX26*、*VrWOX31*、*VrWOX33*、*VrWOX36* 和 *VrWOX40* 含有 5 个共同 motif: motif 1、motif 2、motif 4、motif 16 和 motif 19。亚类 II 中等进化支上的 *VrWOX5*、*VrWOX16*、*VrWOX27*、*VrWOX32*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41* 均含有 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4、motif 6、motif 7、motif 8、motif 9、motif 10、motif 11、motif 12、motif 13、motif 14、motif 15、motif 16 和 motif 19。亚类 III 年轻进化支上的 *VrWOX* 成员均有 motif 1、motif 2、motif 14 和 motif 19。由以上可以看出, *VrWOX* 基因同源关系越近, 结构相似性越大。对 42 个绿豆 *VrWOX* 蛋白 HB 保守结构域所在位置进行分析, 发现 *VrWOX* 蛋白 HB 保守结构域均位于 *VrWOX* 蛋白的 N 端或中间位置, 没有 HB 保守结构域分布在 C 端(图 4D)。

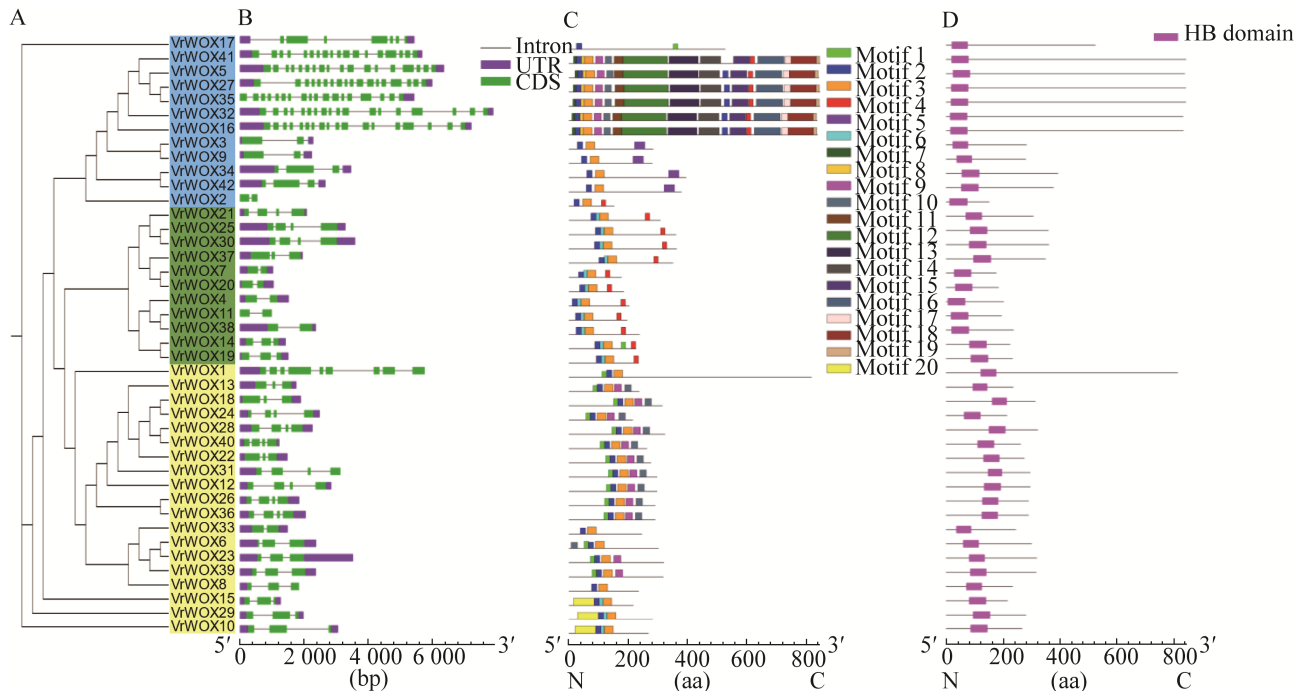


图 4 绿豆 *VrWOX* 基因系统发生关系及基因结构分析

Figure 4 Phylogenetic and gene structure analysis of VrWOX proteins in mungbean. A: Phylogenetic analysis of VrWOX proteins. The phylogenetic tree is made using FastTree with the neighbor-joining method. B: Exon-intron structure analysis of *VrWOX* genes. Exons, introns and UTRs are represented using green boxes, black lines and purple boxes, respectively. C: The distribution of conserved motifs in VrWOX proteins. Each motif is represented by a colored box. D: The homeodomain of VrWOX proteins. The conserved WOX domain is represented by a purple box.

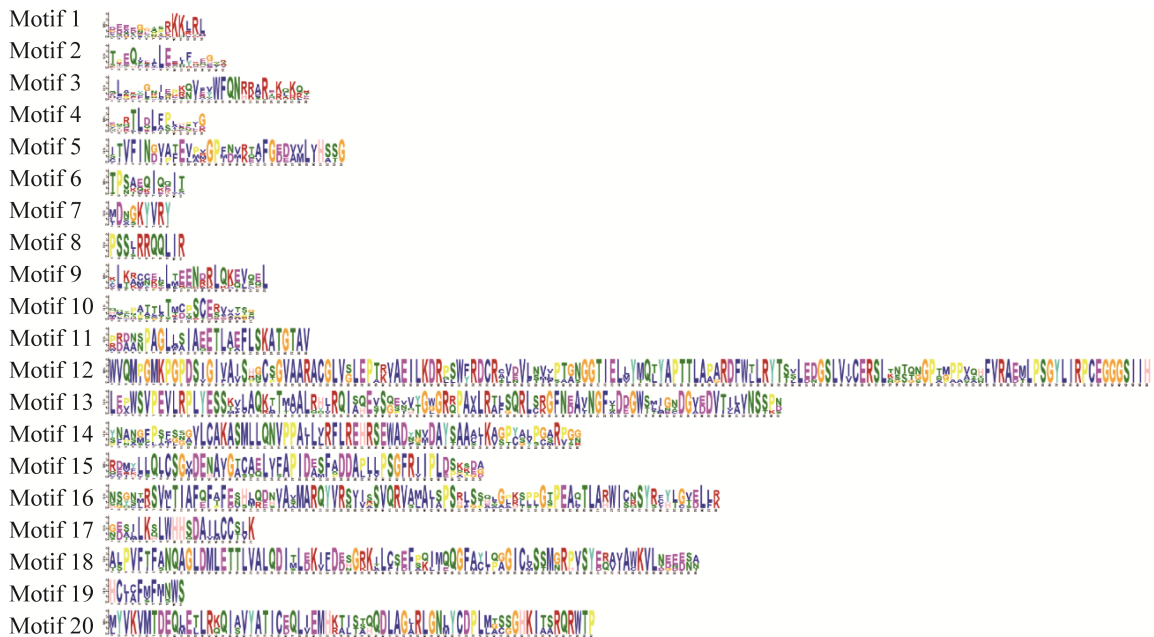


图 5 绿豆 *VrWOX* 蛋白 20 个保守基序序列标识

Figure 5 Sequence logos of the 20 conserved motifs in VrWOX proteins.

2.5 绿豆 *VrWOX* 基因顺式作用元件分析

顺式作用元件通过与转录因子结合影响基因表达,进而调控基因的转录起始和转录效率,鉴定分析 42 个 *VrWOX* 基因启动子区域的顺式作用元件,可为预测其基因功能奠定基础。

首先,在 NCBI 数据库中获取 42 个 *VrWOX* 基因起始密码子 ATG 上游启动子区域碱基序列,利用 PlantCARE^[41]预测这些区域包含的顺式作用元件。从结果中选取具有潜在功能的顺式作用元件,并根据其功能特性,将它们分为 4 个组,激素相关元件、非生物胁迫相关元件、光反应相关元件和发育相关元件(图 6A,已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000153),其位置分布在图 6B 中展示。从图中可以看到,所有 *VrWOX* 基因的启动子都含有一定数量的激素相关元件,如:除 *VrWOX1*、*VrWOX11*、*VrWOX16*、*VrWOX27*、*VrWOX33* 和 *VrWOX39* 外,其他 *VrWOX* 基因均含有脱落酸响应相关元件(已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000153); *VrWOX14*、*VrWOX23* 和 *VrWOX35* 含有的茉莉酸甲酯响应相关元件最多(已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000153);除 *VrWOX3*、*VrWOX6*、*VrWOX7*、*VrWOX8*、*VrWOX10*、*VrWOX15*、*VrWOX17*、*VrWOX22*、*VrWOX25*、*VrWOX27*、*VrWOX33*、*VrWOX36*、*VrWOX39*、*VrWOX40* 和 *VrWOX42* 外,在其他 *VrWOX* 基因中激素相关元件在所有元件中数目最多(已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000153)。除 *VrWOX35* 外,其他 *VrWOX* 基因的启动子区域均含有光反应相关元件;除 *VrWOX37* 外,其他 *VrWOX* 中均存在着非生物胁迫相关元件。例如, *VrWOX14*、*VrWOX25*、*VrWOX35* 和 *VrWOX38* 均含有 3 个非生物胁迫相关元件:防御和应激反应相关元件、低温响

应元件和厌氧诱导元件; *VrWOX27* 仅含有厌氧诱导元件;只有 40%的 *VrWOX* 基因含有发育相关的顺式作用元件,其中 *VrWOX33* 和 *VrWOX36* 含有较多的发育相关元件,分别为 5 个和 4 个。

2.6 *VrWOX* 蛋白互作网络分析

为进一步分析 *VrWOX* 蛋白可能的工作机制,我们对 *VrWOX* 蛋白互作网络进行分析。以拟南芥 *WOX* 同源基因为基础,使用 STRING 数据库对 *VrWOX* 基因家族蛋白进行分析。研究发现 *VrWOX* 蛋白质之间存在着不同的调控通路(图 7)。由于是根据拟南芥氨基酸序列为基础匹配绿豆氨基酸序列,图中 *VrWOX37* 蛋白所在节点代表 *AtWUS* (At2g17950)和 *VrWOX37* 两个蛋白(图 7)。在图 7 中, *VrWOX37* 蛋白与拟南芥中的 *AtTPL* (At1g15750)、*AtCLV2* (At1g65380)和 *AtWOX14* (At1g20700)以及绿豆中的 *VrWOX29*、*VrWOX34*、*VrWOX38* 相互作用。在拟南芥中, *AtCLV* 与 *AtWUS* 通过反馈回路来调节芽尖大小和芽尖完整^[5,48], *AtTPL* (*AtTOPLESS*)可与 *AtWUS* 蛋白相互作用参与拟南芥干细胞稳态^[5]。 *VrWOX37* 与 *AtWUS* 同源关系最近(图 2),并且在网络中与 *CLV1/2/3* (*AtCLV1/2/3*)和 *TPL* (*AtTPL*)存在相互作用(图 7),说明 *VrWOX37* 可能在维系绿豆干细胞稳态中发挥重要作用。此外, *VrWOX6*、*VrWOX8*、*VrWOX9*、*VrWOX17*、*VrWOX21* 和 *VrWOX23* 并未表现出有相关蛋白互作。

2.7 绿豆 *VrWOX* 组织表达模式分析

在植物的不同组织部位,不同基因发挥不同的功能。为了进一步研究 *VrWOX* 基因的功能,我们在绿豆根、根瘤、茎、茎尖、叶、花、荚和种子 8 个组织中检测了绿豆 *VrWOX* 基因的表达(图 8)。从图 8 中可以看到,不同基因在不同组织中表达不同。I类古老进化支上的 *VrWOX26*

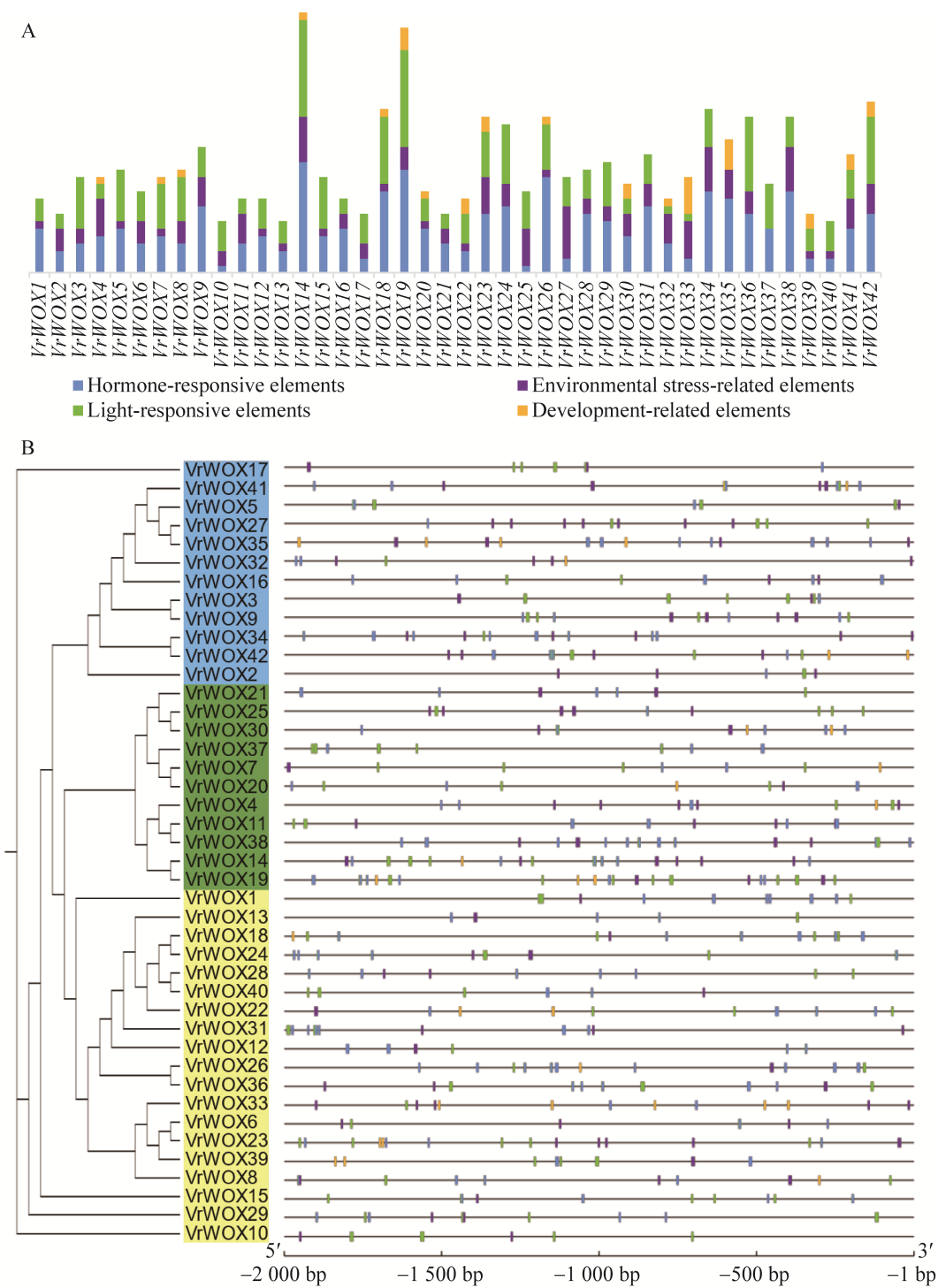


图 6 *VrWOX* 基因启动子区域顺式作用元件分析

Figure 6 Cis-acting element analysis of *VrWOX* promoter regions. A: The number of different types of *cis*-acting elements in *VrWOX* promoters. Different types of *cis*-acting elements in *VrWOX* promoters are presented using different colored boxes. B: The distribution of different types of *cis*-acting elements in the promoter regions of the *VrWOX* genes, 2 000 bp upstream of the initiation codon ATG.

和 *VrWOX33* 在花中表达量较高, 这两个基因和 *AtWOX13* 在同一进化枝上, *AtWOX13* 主要参与拟南芥营养生长向生殖生长的转变^[15], 说明 *VrWOX26* 和 *VrWOX33* 可能参与绿豆生殖发育过程。该分支上的其他 *VrWOX* 基因在其他 7 个组织中均有不同程度地表达, 如: *VrWOX6*、*VrWOX10*、*VrWOX29*、*VrWOX33* 和 *VrWOX36* 在豆荚中表达较高, *VrWOX6*、*VrWOX10* 和 *VrWOX39* 在种子中表达较高, *VrWOX6* 在叶片

中大量表达。II类中等进化支上的 *VrWOX5*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41* 在种子中表达量较高。*AtWOX8* 和 *AtWOX9* 参与拟南芥中胚胎极性建立^[13], 且与这 3 个绿豆 *VrWOX* 基因属于同一进化支, 因而 *VrWOX5*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41* 在绿豆中可能发挥与 *AtWOX8* 和 *AtWOX9* 相似的功能。III类年轻进化支上的 *VrWOX* 基因表达量普遍偏低, 与该年轻进化支上的其他基因相比, *VrWOX30* 在种子的表达量较高。



图 7 VrWOX 蛋白的互作网络

Figure 7 Interaction network of VrWOX proteins. Nodes connected by light blue and purple lines represent known interacting proteins, the nodes connected by green, red and dark blue lines represent proteins that may interact. The node of VrWOX37 protein represents AtWUS (At2g17950) and VrWOX37. AtTPL (At1g15750), AtCLV1 (At1g75820), AtCLV2 (At1g65380) and AtCLV3 (At2g27250) are interact with VrWOX37.

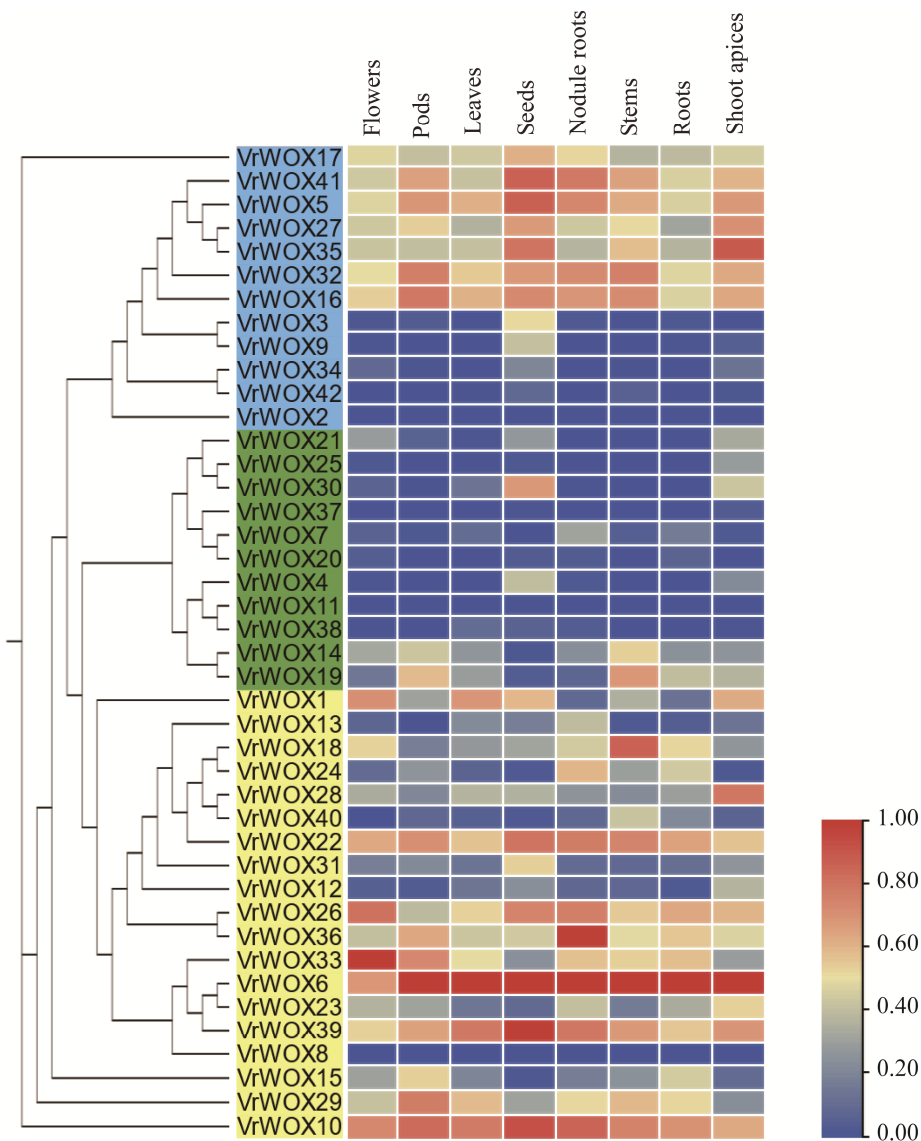


图 8 *VrWOX* 基因在绿豆不同组织中的表达

Figure 8 Expression of *VrWOX* genes in different mungbean tissues. Eight tissues, including flowers, pods, leaves, seeds, nodule roots, stems, roots and shoot apices, are used for gene expression analysis.

3 讨论

WOX 基因参与植物干细胞分化、叶原基形成、体外植株再生等过程^[2], 在植物生长发育过程中具有重要作用。开展 *WOX* 基因功能的研究, 对于解析植物发育调控网络具有重要的意义。近年来, 随着生物技术的发展, *WOX* 基因已在多个豆科植物中报道, 如蒺藜苜蓿、大豆和菜豆^[25]。

然而绿豆 *VrWOX* 基因家族信息尚不清楚。本研究共鉴定出 42 个绿豆 *VrWOX* 基因, 通过对 *VrWOX* 基因染色体位置分析, 发现 7 个 *VrWOX* 基因位于 7 号染色体上, 而其余染色体上含有的 *VrWOX* 基因数目较少, 因而 *VrWOX* 基因在绿豆基因组进化过程中出现了分布不均的现象(图 1), 与其他豆科植物相似^[25]。在绿豆 11 条染色体上都有 *VrWOX* 重复基因的出现(图

3), 因而 *VrWOX* 重复基因可能是在绿豆全基因组加倍过程中形成的。多重事件的出现说明 *VrWOX* 基因家族在绿豆基因组进化过程中不断扩增。对绿豆 12 个 *VrWOX* 重复事件的 Ka/Ks 分析, 发现其比值均低于 1 (表 3), 说明 *VrWOX* 基因主要在纯化选择下进化, 与大多数基因家族进化是相同的^[47]。通过共线性分析, 发现多个与拟南芥 *AtWOX* 和菜豆 *PvWOX* 同源的 *VrWOX* 基因(图 3), 这些 *VrWOX* 基因可能与拟南芥和菜豆中的 *WOX* 同源基因来源于同一个祖先, 可能具有类似的功能。此外, 拟南芥、水稻、绿豆基因组分别为 125、466 和 543 Mb, 而绿豆中 *VrWOX* 基因数量(42 个 *VrWOX*)分别接近拟南芥(16 个 *AtWOX*)和水稻(14 个 *OsWOX*)的 3 倍^[5,19], 因而植物中 *WOX* 基因数量和基因组大小不存在直接关系。绿豆 *VrWOX* 基因 I 类、II 类、III 类亚家族分别含有 19、12 和 11 个成员, 而大豆含有 6、6 和 20 个成员, 菜豆含有 4、3、10 个成员(图 2)^[25]。3 个亚类 *WOX* 基因在豆科作物绿豆、大豆和菜豆中呈现比例不同, 因而 *WOX* 基因在豆科作物基因组进化过程中出现了严重的分化现象。

VrWOX 基因结构差异很大, 不同进化支上的 *VrWOX* 基因结构不尽相同, 因而 *VrWOX* 基因可能具有不同的功能。通过分析保守序列, 发现所有 *VrWOX* 蛋白均含有 motif 1 和 motif 2, 这 2 个 motif 可能代表 *VrWOX* 基因的 HB 保守结构域(图 4)。另外, 我们发现不同进化支上 *VrWOX* 蛋白含有的 motif 组成模式也不同, 和其基因结构相似, 即 *VrWOX* 基因 3 个进化支在进化过程中可能出现了不同的分工(图 4), 与大豆中具有相似的现象^[25]。II 类中等进化支上的 *VrWOX5*、*VrWOX16*、*VrWOX27*、*VrWOX32*、*VrWOX35* 和 *VrWOX41* 均含有 18 个外显子, 而其他 *VrWOX* 基因最多含有 9 个外显子(图 4), 说

明部分 *VrWOX* 基因外显子在进化过程中可能丢失。这 6 个含有 18 个外显子的 *VrWOX* 基因位于同一进化分支上, 同源关系较近, 由 16 个相同的 motif 组成(图 4B), 并且这 6 个 *VrWOX* 基因中出现了 3 个重复基因事件: *VrWOX16/32*、*VrWOX16/41* 和 *VrWOX32/41*。由此说明, *VrWOX16*、*VrWOX32* 和 *VrWOX41* 可能由同一祖先演化而来。此外, 大豆 *WOX* 基因外显子数目为 2–4 个, 与绿豆存在很大差异, 因而豆科作物在进化过程中基因结构发生了很大改变^[25]。

对绿豆 *VrWOX* 基因启动子区域顺式作用元件分析, 发现除 *VrWOX35* 外, 其他 *VrWOX* 基因均含有光反应元件, 因此 *VrWOX35* 可能不参与绿豆光反应过程。*VrWOX27* 的启动子区域不含有发育相关元件, 但含有较多的非生物胁迫相关元件(图 6), 因而 *VrWOX27* 可能不参与植株发育过程, 而是主要参与绿豆非生物胁迫响应过程。*VrWOX14*、*VrWOX23* 和 *VrWOX35* 具有最多的茉莉酸甲酯响应相关元件(已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000153), 说明这 3 个 *VrWOX* 基因可能参与植物生长发育与抵御逆境胁迫等过程。此外, 虽然有些 *VrWOX* 基因含有多种顺式作用元件, 但是 *VrWOX* 基因并不是在所有组织中都表达。植物基因表达除受顺式作用元件调控外, 还受到很多其他因素调控, 例如生物钟和表观遗传。这些 *VrWOX* 基因可能会在不同发育时期或不同时间段表达。*VrWOX* 基因表达模式与其功能存在着密切关系, III 类年轻进化支上的 11 个 *VrWOX* 基因在各个部位表达量均偏低(图 8), 因而 III 类 *VrWOX* 基因在绿豆生长发育阶段可能不起作用或起微弱作用。在蛋白互作网络中, *VrWOX37* 与多个 *VrWOX* 蛋白及拟南芥 *AtCLV* 和 *AtTPL* 存在相互作用(图 7)。*AtCLV*、*AtTPL* 和 *AtWUS* 相互作用共同维持拟南芥芽尖干细胞稳态^[48], 因而 *VrWOX37* 极有可

能也是绿豆茎分生组织干细胞分化过程中的关键基因。

综上所述,本研究共鉴定了 42 个绿豆 *VrWOX* 基因,并对其氨基酸数目、分子量、等电点和蛋白调控网络进行分析。*VrWOX* 基因在绿豆染色体上分布不均匀,其在 7 号染色体分布最多。*VrWOX* 基因主要分为 3 个亚类:亚类 I 含有 19 个成员,亚类 II 含有 12 个成员,亚类 III 含有 11 个成员。不同亚类 *VrWOX* 基因结构和 motif 差异较大,并且不同 *VrWOX* 基因启动子区域含有不同种类和数量的顺式作用元件,因而 *VrWOX* 基因在不同组织中表现出不同的表达模式。本研究的开展不仅鉴定了绿豆 *VrWOX* 基因家族,还为后续绿豆植株发育调控机制的解析奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] van der GRAAFF E, LAUX T, RENSING SA. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12): 1-9.
- [2] SHI L, WANG K, DU LP, SONG YX, LI HH, YE XG. Genome-wide identification and expression profiling analysis of WOX family protein-encoded genes in triticeae species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9325.
- [3] HAECKER A, GROß-HARDT R, GEIGES B, SARKAR A, BREUNINGER H, HERRMANN M, LAUX T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2004, 131(3): 657-668.
- [4] ZHANG YX, WU RH, QIN GJ, CHEN ZL, GU HY, QU LJ. Over-expression of *WOX1* leads to defects in meristem development and polyamine homeostasis in *Arabidopsis* F[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(6): 493-506.
- [5] DOLZBLASZ A, NARDMANN J, CLERICI E, CAUSIER B, van der GRAAFF E, CHEN JH, DAVIES B, WERR W, LAUX T. Stem cell regulation by *Arabidopsis WOX* genes[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(7): 1028-1039.
- [6] JHA P, OCHATT SJ, KUMAR V. WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(4): 431-444.
- [7] VANDENBUSSCHE M. The role of *WOX1* genes in blade development and beyond[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(5): 1514-1516.
- [8] HASSANI SB, TRONTIN JF, RASCHKE J, ZOGLAUER K, RUPPS A. Constitutive overexpression of a conifer *WOX2* homolog affects somatic embryo development in *Pinus pinaster* and promotes somatic embryogenesis and organogenesis in *Arabidopsis* seedlings[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 838421.
- [9] SUER S, AGUSTI J, SANCHEZ P, SCHWARZ M, GREB T. *WOX4* imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3247-3259.
- [10] BETEGÓN-PUTZE I, MERCADAL J, BOSCH N, PLANAS-RIVEROLA A, MARQUÈS-BUENO M, VILARRASA-BLASI J, FRIGOLA D, BURKART RC, MARTÍNEZ C, CONESA A, SOZZANI R, STAHL Y, PRAT S, IBÁÑES M, CAÑO-DELGADO AI. Precise transcriptional control of cellular quiescence by BRAVO/*WOX5* complex in *Arabidopsis* roots[J]. *Molecular Systems Biology*, 2021, 17(6): e9864.
- [11] PARK SO, ZHENG ZG, OPPENHEIMER DG, HAUSER BA. The *PRETTY FEW SEEDS2* gene encodes an *Arabidopsis* homeodomain protein that regulates ovule development[J]. *Development*, 2005, 132(4): 841-849.
- [12] KONG DY, HAO YL, CUI HC. The WUSCHEL related homeobox protein *WOX7* regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(2): 261-270.
- [13] UEDA M, ZHANG ZJ, LAUX T. Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development[J]. *Developmental Cell*, 2011, 20(2): 264-270.
- [14] LIU JC, SHENG LH, XU YQ, LI JQ, YANG ZN, HUANG H, XU L. *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3): 1081-1093.
- [15] 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*[J]. *BMC Evolutionary*

- Biology, 2008, 8(1): 1-19.
- [16] IKEUCHI M, IWASE A, ITO T, TANAKA H, FAVERO DS, KAWAMURA A, SAKAMOTO S, WAKAZAKI M, TAMESHIGE T, FUJII H, HASHIMOTO N, SUZUKI T, HOTTA K, TOYOOKA K, MITSUDA N, SUGIMOTO K. Wound-inducible WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 13 is required for callus growth and organ reconnection[J]. Plant Physiology, 2022, 188(1): 425-441.
- [17] DENIS E, KBIRI N, MARY V, CLAISSE G, CONDE E SILVA N, KREIS M, DEVEAUX Y. *WOX14* promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2017, 90(3): 560-572.
- [18] ETCHELLES JP, PROVOST CM, MISHRA L, TURNER SR. *WOX4* and *WOX14* act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation[J]. Development, 2013, 140(10): 2224-2234.
- [19] 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]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(11): 1016-1026.
- [20] LI MD, WANG RH, LIU ZY, WU XM, WANG JB. Genome-wide identification and analysis of the WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveals changes in *WOX* genes during polyploidization[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-19.
- [21] HAN N, TANG R, CHEN XQ, XU ZX, REN ZH, WANG LN. Genome-wide identification and characterization of *WOX* genes in *Cucumis sativus*[J]. Genome, 2021, 64(8): 761-776.
- [22] 李晓旭, 刘成, 李伟, 张增林, 高晓明, 周慧, 郭永峰. 番茄 WOX 转录因子家族的鉴定及其进化、表达分析[J]. 遗传, 2016, 38(5): 444-460.
- LI XX, LIU C, LI W, ZHANG ZL, GAO XM, ZHOU H, GUO YF. Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the WOX family genes in *Solanum lycopersicum*[J]. Hereditas, 2016, 38(5): 444-460 (in Chinese).
- [23] LI Z, LIU D, XIA Y, LI ZL, JING DD, DU JJ, NIU N, MA SC, WANG JW, SONG YL, YANG ZQ, ZHANG GS. Identification of the WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family, and interaction and functional analysis of TaWOX9 and TaWUS in wheat[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1581.
- [24] ALVAREZ JM, BUENO N, CAÑAS RA, AVILA C, CÁNOVAS FM, ORDÁS RJ. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in *Pinus pinaster*: new insights into the gene family evolution[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 123: 304-318.
- [25] HAO QN, ZHANG L, YANG YY, SHAN ZH, ZHOU XA. Genome-wide analysis of the WOX gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean[J]. Plants, 2019, 8(7): 215.
- [26] TADEGE M, LIN H, NIU LF, MYSORE KS. Control of dicot leaf blade expansion by a *WOX* gene, *STF*[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(11): 1861-1864.
- [27] WOLABU TW, WANG H, TADESSE D, ZHANG F, BEHZADIRAD M, TVOROGOVA VE, ABDELMAGEED H, LIU Y, CHEN NC, CHEN JH, ALLEN RD, TADEGE M. WOX9 functions antagonistic to STF and LAM1 to regulate leaf blade expansion in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris*[J]. New Phytologist, 2021, 229(3): 1582-1597.
- [28] OSIPOVA MA, MORTIER V, DEMCHENKO KN, TSYGANOV VE, TIKHONOVICH IA, LUTOVA Ia, DOLGIKH EA, GOORMACHTIG S. *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation[J]. Plant Physiology, 2012, 158(3): 1329-1341.
- [29] ZHUANG LL, AMBROSE M, RAMEAU C, WENG L, YANG J, HU XH, LUO D, LI X. LATHYROIDES, encoding a WUSCHEL-related homeobox1 transcription factor, controls organ lateral growth, and regulates tendril and dorsal petal identities in garden pea (*Pisum sativum* L.)[J]. Molecular Plant, 2012, 5(6): 1333-1345.
- [30] ABELLÁN Á, DOMÍNGUEZ-PERLES R, MORENO D, GARCÍA-VIGUERA C. Sorting out the value of cruciferous sprouts as sources of bioactive compounds for nutrition and health[J]. Nutrients, 2019, 11(2): 429.
- [31] HOU DZ, YOUSAF L, XUE Y, HU JR, WU JH, HU XS, FENG NH, SHEN Q. Mung bean (*Vigna radiata* L.): bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits[J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1238.
- [32] LAMESCH P, BERARDINI TZ, LI DH, SWARBRECK D, WILKS C, SASIDHARAN R, MULLER R, DREHER K, ALEXANDER DL,

- GARCIA-HERNANDEZ M, KARTHIKEYAN AS, LEE CH, NELSON WD, PLOETZ L, SINGH S, WENSEL A, HUALA E. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1): D1202-D1210.
- [33] POTTER SC, LUCIANI A, EDDY SR, PARK Y, LOPEZ R, FINN RD. HMMER web server: 2018 update[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [34] ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [35] PRICE MN, DEHAL PS, ARKIN AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [36] HU B, JIN JP, GUO AY, ZHANG H, LUO JC, GAO G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [37] BAILEY TL, BODEN M, BUSKE FA, FRITH M, GRANT CE, CLEMENTI L, REN J, LI WW, NOBLE WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Web Server): W202-W208.
- [38] VOORRIPS RE. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. Journal of Heredity, 2002, 93(1): 77-78.
- [39] WANG YP, TANG HB, DEBARRY JD, TAN X, LI JP, WANG XY, LEE TH, JIN HZ, MARLER B, GUO H, KISSINGER JC, PATERSON AH. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [40] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, CONNORS J, GASCOYNE R, HORSMAN D, JONES SJ, MARRA MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1639-1645.
- [41] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, van de PEER Y, ROUZÉ P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [42] LI S, WANG XT, XU WY, LIU T, CAI CM, CHEN LY, CLARK CB, MA JX. Unidirectional movement of small RNAs from shoots to roots in interspecific heterografts[J]. Nature Plants, 2021, 7(1): 50-59.
- [43] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [44] MA XF, XU WY, LIU T, CHEN RY, ZHU H, ZHANG HY, CAI CM, LI S. Functional characterization of soybean (*Glycine max*) *DIRIGENT* genes reveals an important role of *GmDIR27* in the regulation of pod dehiscence[J]. Genomics, 2021, 113(1): 979-990.
- [45] KONDRASHOV FA, ROGOZIN IB, WOLF YI, KOONIN EV. Selection in the evolution of gene duplications[J]. Genome Biology, 2002, 3(2): 1-9.
- [46] KANG YJ, KIM SK, KIM MY, LESTARI P, KIM KH, HA BK, JUN TH, HWANG WJ, LEE T, LEE J, SHIM S, YOON MY, JANG YE, HAN KS, TAEPRAYOON P, YOON N, SOMTA P, TANYA P, KIM KS, GWAG JG, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5443.
- [47] JIA K, YAN CY, ZHANG J, CHENG YX, LI WW, YAN HZ, GAO J. Genome-wide identification and expression analysis of the *JAZ* gene family in turnip[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 21330.
- [48] NEMEC-VENZA Z, MADDEN C, STEWART A, LIU W, NOVÁK O, PĚNČÍK A, CUMING AC, KAMISUGI Y, HARRISON CJ. *CLAVATA* modulates auxin homeostasis and transport to regulate stem cell identity and plant shape in a moss[J]. New Phytologist, 2022, 234(1): 149-163.

(本文责编 郝丽芳)